



**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires**

**Efecto de la leptina sobre el desarrollo y
metabolismo embrionario y placentario en la
gestante diabética**

Palabras clave: *gestación-leptina-diabetes-lípidos-óxido nítrico-
placenta-embrión-organogénesis*

Tesis para ser presentada para optar por el grado de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área de Biología

Lic. Verónica White

Director de Tesis: Dra. Alicia S. Jawerbaum

Director asistente: Dra. Élide T. González

Consejero de Estudios: Dra. Graciela Guerrero

Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos

(CEFyBO-CONICET)

Buenos Aires, 4 de Julio de 2005



**School of Exact and Natural Sciences
University of Buenos Aires**

**Leptin effects on embryonic and placental
development and metabolism during diabetic
pregnancy**

Key words: pregnancy-leptin-diabetes-lipids-nitric oxide-placenta-
embryo-organogenesis

This thesis is to be presented in order to obtain the degree of: Doctor of the
University of Buenos Aires in the area of Biology

Lic. Verónica White

Thesis Director: Dr. Alicia S. Jawerbaum

Assistant Director: Dr. Élide T. González

Studies Council: Dr. Graciela Guerrero

Center of Pharmacological and Botanical Studies

(CEFyBO-CONICET)

Buenos Aires, July 4th 2005

“Efecto de la leptina sobre el desarrollo y metabolismo embrionario y placentario en la gestante diabética”

Resumen

En este trabajo se ha evaluado el rol de la leptina sobre el desarrollo embrionario, el metabolismo lipídico embrionario y placentario, y la producción de NO embrionaria y placentaria en la rata sana, en modelos experimentales de diabetes y en la placenta de mujer sana y con diabetes mellitus.

La leptina está disminuida en tejido placentario de ratas y mujeres diabéticas, y en embriones de ratas diabéticas. En estos últimos es capaz de regular negativamente la producción embrionaria de NO, importante morfógeno, que se encuentra en niveles elevados en embriones de rata diabética. La hormona, en cambio, modula positivamente la producción de NO en placenta de rata sana y diabética.

La leptina provoca una disminución en las concentraciones de lípidos neutros en embriones de rata diabética. En la placenta de estos animales, donde se observa un incremento del catabolismo lipídico y una disminución en la síntesis lipídica *de novo*, así como en la placenta de rata sana, la hormona regula negativamente los niveles lipídicos, a través de un aumento en la actividad catabólica placentaria, sin influenciar la síntesis lipídica *de novo*.

Estas funciones de la leptina se evidencian también en el tejido placentario humano.

El trabajo realizado ha permitido identificar en el embrión y la placenta funciones parácrinas de la leptina relacionadas con el metabolismo lipídico y nitridérgico. Las anomalías en los niveles de leptina embrionarios y placentarios en la diabetes, vinculan a esta hormona con las alteraciones reproductivas inducidas en esta patología.

“Leptin effects on embryonic and placental development and metabolism during diabetic pregnancy”

Summary

In this thesis work, the role of leptin on embryonic development, embryonic and placental lipid metabolism, and embryonic and placental NO production has been evaluated in control rats, in rat diabetic models and in human placenta.

Leptin levels are decreased in placental tissues from diabetic rats and patients, and in the embryos from diabetic rats. In those embryos, leptin negatively regulated NO production, being NO a morphogen whose levels are increased in the embryos from diabetic rats. Differently, the hormone positively regulated NO production in the placenta from control and diabetic rats.

Leptin induced a decrease in neutral lipid concentrations in the embryos from diabetic rats. In the placenta from these animals, where an enhanced lipid catabolism and a reduction in the *de novo* lipid synthesis is observed, and also in control placenta, the hormone negatively regulated lipid levels, through an enhancement in the placental lipid catabolism and without modifications in the *de novo* lipid synthesis.

The observed leptin functions were also found in the human placenta.

The studies performed in this work allowed the identification of paracrine functions of leptin related with the nitridergic and lipidic metabolism in embryos and placenta. The anomalies in embryonic and placental leptin levels in the diabetic disease provide a link between this hormone and the reproductive alterations induced by this pathology.

Índice

Página

<u>Introducción</u>	1
• La Gestación.....	1
El embrión en etapa de organogénesis temprana.....	1
La placenta de rata: estructura y función.....	6
La placenta humana: estructura y función.....	9
• Diabetes Mellitus.....	11
Diabetes tipo 1.....	12
Diabetes tipo 2.....	12
Diabetes gestacional.....	14
Modelos experimentales de diabetes.....	14
• Diabetes y Preñez.....	16
Adaptaciones metabólicas en la gestante sana y diabética.....	16
Diabetes en la organogénesis temprana.....	18
La placenta de rata diabética.....	20
La placenta de paciente diabética.....	21
• Lípidos.....	22
Estructura y función.....	22
Lípidos neutros.....	23
Lípidos polares.....	24
Lípidos y diabetes.....	24
El metabolismo lipídico en la organogénesis temprana.....	25
El metabolismo lipídico en la placenta.....	27
• Metabolismo del Óxido Nítrico.....	30
Funciones biológicas.....	30
Óxido nítrico y diabetes.....	32
Óxido nítrico en la organogénesis temprana.....	34
Óxido nítrico y placenta.....	35
• Leptina.....	37
Leptina y diabetes.....	40
Leptina y preñez.....	42
<u>Hipótesis y Objetivos</u>	46
<u>Materiales y métodos</u>	48
• Animales.....	48
• Pacientes.....	48
• Materiales.....	48
• Métodos.....	51
• Inducción del modelo de diabetes experimental.....	51
• Obtención de suero de rata.....	52
• Determinaciones en suero.....	52
Leptinemia.....	52
Insulinemia.....	53
• Determinaciones embrionarias.....	53
Cultivo de embriones en etapa de organogénesis temprana.....	53

Evaluaciones morfológicas.....	54
Obtención de embriones de día 10.5 de preñez.....	54
Medición de proteínas.....	55
Inmunolocalización de leptina.....	55
Determinación de los niveles de leptina embrionaria.....	57
Dosaje de los niveles de nitratos/nitritos embrionarios.....	57
Análisis del metabolismo lipídico.....	58
Determinación de los niveles de lípidos embrionarios.....	58
Determinación de la síntesis lipídica <i>de novo</i> embrionaria.....	59
• Determinaciones en tejido placentario.....	59
Obtención del tejido placentario de rata.....	59
Preparación del tejido placentario humano.....	60
Determinación de proteínas.....	60
Determinación del contenido de leptina.....	61
Evaluación del metabolismo nitridérgico.....	61
Actividad óxido nítrico sintasa.....	61
Niveles de nitratos/nitritos placentarios.....	62
Análisis del metabolismo lipídico.....	63
Determinación de los niveles de lípidos placentarios.....	63
Determinación de la síntesis lipídica <i>de novo</i> placentaria.....	64
Determinación del catabolismo lipídico placentario.....	65
Inmunolocalización de leptina, receptor de leptina, iNOS y eNOS....	66
• Cultivos de trofoblastos humanos.....	68
• Estadística.....	70
Resultados	71
<i>Características del modelo de diabetes</i>	71
Capítulo I: Desarrollo y metabolismo del embrión de rata sana y diabética durante la organogénesis temprana: Efecto de leptina	72
<i>Efectos de la diabetes sobre el desarrollo embrionario en la etapa de organogénesis temprana</i>	72
<i>Efecto de la leptina en el desarrollo del embrión de rata sana y diabética durante la organogénesis temprana</i>	75
❖ Niveles e inmunolocalización de leptina embrionaria.....	76
❖ Efectos de la adición de leptina sobre el desarrollo y crecimiento embrionario.....	78
<i>Metabolismo lipídico en el embrión de rata diabética: efecto modulador de leptina</i>	81
❖ Niveles lipídicos en embrión de rata sana y diabética: efecto de leptina.....	81
❖ Síntesis lipídica <i>de novo</i> en embriones de rata sana y diabética: efecto de leptina.....	85

<i>Metabolismo de óxido nítrico del embrión de rata sana y diabética.....</i>	90
❖ Producción de óxido nítrico por parte de embriones de rata sana y diabética: Efecto de leptina.....	90
Capítulo II: Alteraciones placentarias inducidas por la diabetes materna: Efecto de leptina.....	92
<i>Niveles e inmunolocalización de leptina en la preñez a término de rata sana y diabética.....</i>	93
❖ Niveles de leptina en tejido placentario.....	93
❖ Inmunolocalización de leptina y su receptor en tejido placentario.....	94
<i>Efectos de leptina sobre el metabolismo lipídico en placenta a término de rata sana y diabética.....</i>	97
❖ Niveles de lípidos placentarios: Efecto de leptina.....	98
❖ Síntesis lipídica placentaria: Efecto de leptina.....	102
❖ Catabolismo lipídico placentario: Efecto de leptina.....	106
<i>Efecto de leptina sobre el metabolismo de óxido en placenta a término de rata sana y diabética.....</i>	107
❖ Inmunolocalización placentaria de iNOS y eNOS.....	108
❖ Producción de NO placentaria: Efecto de leptina.....	111
❖ Efecto de NO sobre el metabolismo lipídico placentario.....	113
Niveles de lípidos en placenta de rata sana y diabética.....	114
Síntesis lipídica placentaria. Efecto de NO.....	117
Catabolismo lipídico placentario. Efecto de NO.....	121
<i>Alteraciones placentarias en la mujer con diabetes pre-gestacional y gestacional</i>	122
❖ Niveles de leptina en la placenta a término de paciente sana y con Diabetes Mellitus.....	124
❖ Producción del óxido nítrico: Efecto de leptina.....	126
<i>Efectos de leptina sobre el metabolismo lipídico en placenta humana... </i>	127
❖ Niveles de lípidos en la placenta humana: Efecto de leptina.....	127
❖ Síntesis lipídica <i>de novo</i> en la placenta humana: Efecto de leptina.....	131
❖ Catabolismo lipídico en la placenta humana: Efecto de leptina.....	135
<i>Cultivo de trofoblastos humanos.....</i>	137
<u>Discusión</u>.....	139
<u>Conclusiones</u>.....	153
<u>Referencias Bibliográficas</u>.....	158

Introducción

LA GESTACIÓN

Se entiende por proceso de gestación a aquél que caracteriza a los mamíferos desde el momento de la fecundación hasta el momento del parto. Dependiendo de la especie, este proceso tiene variaciones en cuanto a la duración y a los mecanismos que lo modulan, sin embargo tiene una secuencia en común: El proceso de gestación comienza con la **fecundación**. Este es el proceso en el cual el espermatozoide fecunda al óvulo. Posteriormente el **embrión pre-implantatorio** se traslada por el oviducto hasta el útero, donde alcanza la etapa de **blastocisto** y se implanta. Este proceso se denomina **Implantación** y durante el mismo el embrión invade la pared uterina para penetrar y fijarse a la misma. La implantación implica el inicio de la formación de la placenta que vinculará al embrión en desarrollo con la circulación materna hasta el momento del parto. Estos eventos están regulados por hormonas pertenecientes al eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, por citoquinas y múltiples moléculas de señalización autocrina y paracrina.

El metabolismo materno se modifica para proveer al embrión del entorno y nutrientes necesarios para su correcto desarrollo y crecimiento. Las concentraciones hormonales maternas varían, nuevas hormonas se sintetizan en la placenta y éstas mismas junto con las pre-existentes crean una regulación metabólica diferente, según conviene a la nueva vida en gestación. Se prioriza de esta forma la correcta nutrición y oxigenación del embrión necesarias para su normal desarrollo.

El embrión en etapa de organogénesis temprana

Desde la fecundación el proceso de desarrollo del embrión implica una serie de sucesivas divisiones celulares; el embrión llega al estadio de **mórula**. Si bien en este estadio las células son pluripotenciales, aquéllas que se encuentran en el interior de la misma constituyen la masa celular interna o **embrioblasto** que más tarde formará el embrión, y las ubicadas externamente dan lugar a la masa celular externa, que dará origen a las membranas extraembrionarias y la placenta. En el pasaje de mórula a **blastocisto** se incorpora fluido que queda atrapado por las uniones estrechas de las células de la masa externa que conforman el **trofoblasto**. La incorporación de fluido determina la aparición de

una cavidad, el blastocele; el embrioblasto forma una masa compacta en un lado de la cavidad y el trofoblasto forma una monocapa celular alrededor: se forma el **blastocisto**. El blastocisto, debido a la acción de diversas enzimas, se “escapa”, produciéndose la eliminación de la zona pellucida, en un proceso llamado “hatching”, y luego se implanta en el útero. En el proceso de implantación el trofoblasto invade el endometrio penetrando hasta quedar inmerso en la pared uterina; en este punto el embrión es bilaminar, y está formado por el **epiblasto** o ectodermo primario y el **hipoblasto** o endodermo primario. El epiblasto comienza a coleccionar fluido y se forma una nueva cavidad: la cavidad amniótica; algunas células del epiblasto se diferencian a amnioblastos que formarán la membrana amniótica. Células del hipoblasto se diferencian a mesodermo extraembrionario y migran formando la membrana de Reichert y la cavidad coriónica. Una nueva migración del hipoblasto termina de conformar el verdadero **saco vitelino**.

Una vez formado el mesodermo extraembrionario, se produce un surco en la región caudal del epiblasto: el surco primitivo. Las células epiblasticas se desprenden a lo largo del surco y migran a través del mismo al espacio virtual entre el epi y el hipoblasto. Algunas invaden el hipoblasto para formar el endodermo, otras migran lateral o cefálicamente y forman el mesodermo embrionario. Luego el epiblasto se transforma en ectodermo, el embrión se convierte en trilaminar y se establece el eje cefalo-caudal, el embrión comienza la **organogénesis temprana**.

El mesodermo recientemente diferenciado, entre el neuroectodermo y el endodermo, forma la **placa precordial**. Hacia la parte caudal de la misma y a partir de células mesodérmicas que avanzan en el sentido cefalo-caudal, se forma el **proceso notocordal**. Posteriormente la parte ventral de esta estructura se fusiona con el endodermo para formar primero la **placa notocordal** y luego un cordón mesodérmico llamado **notocorda**. Las células mesodérmicas que migraron de forma lateral y que no se involucraron en el proceso notocordal ni en la placa precordial forman estructuras a ambos lados de la notocorda. Dos condensaciones cilíndricas, forman el **mesodermo paraxial**, lateralmente a éstas se forman otras dos condensaciones cilíndricas (mesodermo intermedio) y por último, al lado de éste, dos estructuras bilaminares constituyen la **placa lateral mesodérmica**. El mesodermo paraxial, se compacta y segmenta originando los **somitómeros**, estructuras que se diferencian en sentido cefalo-caudal. Los primeros siete pares de somitómeros forman los arcos faríngeos y los demás dan lugar a las **somitas**. Estas estructuras ubicadas de a pares a ambos lados de la notocorda darán origen a los músculos dorsales, músculos del cuerpo y miembros, costillas, vértebras y dermis dorsal. Debido a que las somitas se diferencian de manera paulatina y en sentido cefalo-caudal, se puede establecer, dentro

de determinado rango, el estadio del desarrollo del embrión de acuerdo a la cantidad de somitas diferenciadas. (Kaufman 1990, Rancourt y col 1997)

El **proceso notocordal** induce la diferenciación de células del ectodermo a células neuroepiteliales que formarán la **placa neural**, dando comienzo a la neurulación. En primer lugar se forma una depresión en la placa neural y luego los bordes de esta depresión crecen para formar los pliegues o **crestas neurales**. Posteriormente las crestas seguirán creciendo hasta unirse y cerrarse para formar el **tubo neural** que dará lugar a la formación de la médula espinal y las estructuras del sistema nervioso central. Sin embargo, hay dos estructuras del tubo neural que permanecen abiertas durante más tiempo manteniendo la comunicación con la cavidad amniótica, una en la región cefálica y otra en la región caudal: el neuroporo anterior y el neuroporo posterior.

Durante la **neurulación**, células de las crestas neurales migran hacia otras partes del embrión. En la región cefálica dicha migración ocurre antes del cierre del tubo neural, mientras que en la región espinal estas células migran una vez que el tubo neural se ha cerrado. Las células derivadas de cresta neural darán lugar, entre otras, a las neuronas y células de la glia, así como a las células de Schwann y a células componentes de los huesos faciales y craneales ventrales. También son derivados de células de cresta neural aquellas que componen el tejido conectivo del endotelio, estroma de córneas, dermis, tejido adiposo de la piel de cabeza y cuello, glándulas salivales, lagrimales, timo, tiroides y pituitaria. Asimismo, tienen origen en las células de la cresta neural aquellas que constituyen el músculo liso de grandes arterias y las células pigmentadas.

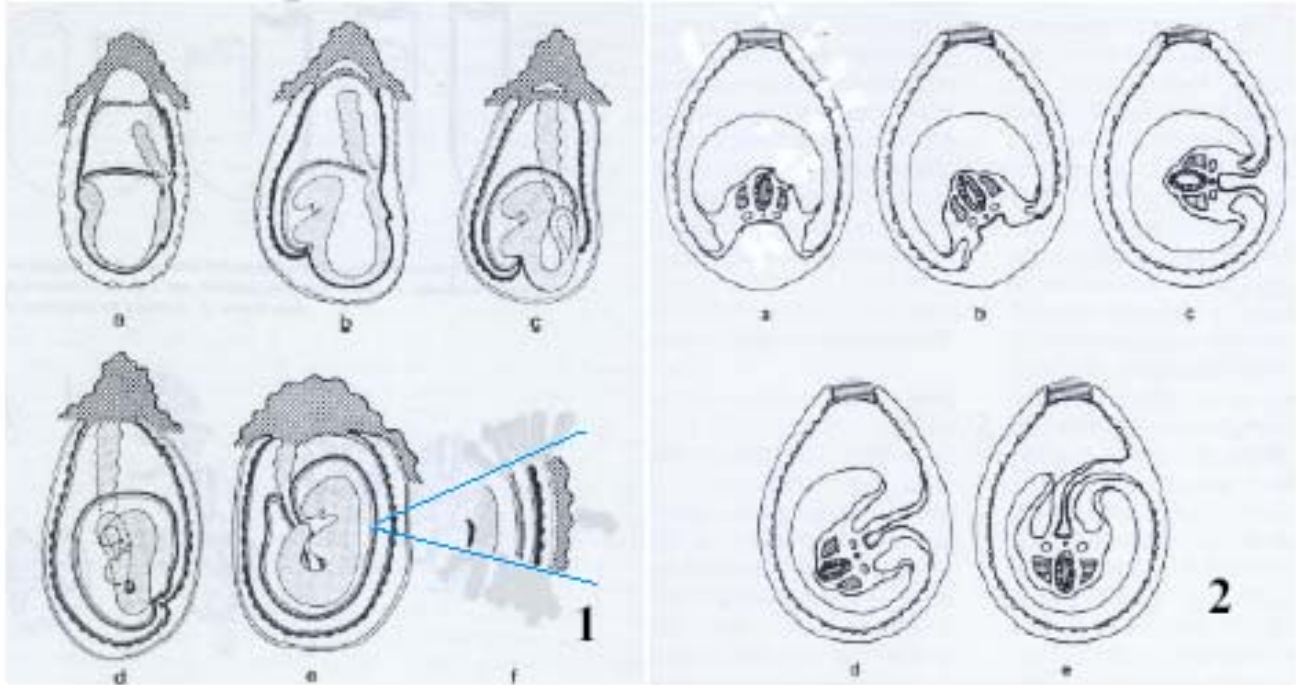
El proceso de neurulación es un periodo de exposición a la cavidad amniótica de aquellas estructuras originarias del sistema nervioso y a través de la misma, al medio en el que se desarrolla el embrión. En este periodo la susceptibilidad a potenciales agentes teratógenos es alta, y los defectos en el cierre del tubo neural llevan a malformaciones como la espina bífida y sus derivados meningocele, meningomiocelo e hidrocefalia. Fallas más graves como la falta de diferenciación de células neuroepiteliales pueden llevar a la anencefalia. La observación del cierre del tubo neural en la etapa de organogénesis temprana es una herramienta útil para la evaluación del desarrollo embrionario y de potenciales teratógenos. (New y col 1977, New 1978)

A partir de la **placa lateral mesodérmica esplácnica** se forma una estructura en forma de herradura hueca que constituye la **región cardiogénica**. Esta región contiene a dos tubos

endocardiales, que se fusionan ventralmente al tubo endodérmico que constituirá el tubo digestivo. La fusión de los tubos endocardiales forma un único compartimiento, se genera así una cámara que tiene actividad pulsátil aún antes de asumir su función como bombeadora de sangre. El mesodermo esplácnico, recubre el endotelio del tubo endocardial fusionado y se diferencia en una parte externa llamada miocardio, la cual separándose del endotelio, secreta una masa acelular de matriz. El conjunto de miocardio, matriz y endocardio se denomina **corazón primitivo**. La región cefálica del mismo originará los arcos aórticos, y la región caudal, los senos venosos que formarán las venas vitelinas. Estas venas serán las que transporten los nutrientes desde el saco vitelino al atrium primitivo, pasando luego al ventrículo primitivo para luego ser transportados a la aorta por las contracciones ventriculares. La temprana función del corazón aún cuando no está totalmente formado, obedece a las necesidades embrionarias de nutrición, transporte y excreción. A medida que la masa celular aumenta y las estructuras se complejizan, la difusión a través del saco vitelino no es suficiente y el embrión requiere de una estructura capaz de satisfacer sus necesidades cada vez mayores. Posteriormente el corazón rotará, se tabicará formando las cuatro cámaras y se formarán las válvulas que impedirán el reflujo sanguíneo. Alteraciones en el proceso de desarrollo cardíaco da lugar a diversas anomalías como fallas en la tabicación, en la formación de las válvulas, en la formación de los arcos aórticos y en la rotación e hiperplasia cardíaca. (Larsen 1997, Compennolle y col 2003)

Los eventos de plegamiento forman numerosas estructuras como el tubo digestivo, el septo transversal y la región cardiogénica entre otros. En roedores, además existe un proceso llamado **rotación axial** (Esquema A). El embrión que se encuentra en un estadio en el que se visualizan hasta 10-12 somitas, tiene forma de “U” en un corte sagital, exponiendo su parte ventral y protegiendo en la parte interna al neuroectodermo. En el proceso de rotación el embrión adopta su característica posición fetal, quedando expuesto el neuroectodermo en la parte convexa y la zona ventral en la parte cóncava. En la rotación, el embrión se invagina y queda rodeado externamente por el amnios y por el saco vitelino. Este proceso es uno de los parámetros a evaluar para determinar el grado de desarrollo embrionario. (Kaufman 1990)

Esquema del embrión en etapa de organogénesis temprana: movimientos de rotación



Esquema A 1: Diagrama de un corte longitudinal embrionario en distintos estadios a) estadio de pliegue neural pre-somítico, b) embrión con 8-10 pares de somitas, c) embrión con 10-12 pares de somitas, d) embrión con 12-14 pares de somitas, e) embrión con 15-20 pares de somitas f) membranas embrionarias incluyendo endodermo, mesodermo, ectodermo, amnios, saco vitelino, membrana de Reichert y cono ectoplacentario.

Esquema A 2: Diagrama de un corte transversal embrionario en distintas etapas de la rotación axial a) embrión sin rotar, b-d) embrión en proceso de rotación, e) embrión rotado.

La nutrición embrionaria en los primeros estadios del desarrollo ocurre mediante difusión simple de sustancias de célula a célula, para luego depender del saco vitelino. Esta estructura mediará en el transporte de nutrientes y oxígeno hacia el embrión y de sustancias de deshecho embrionarias. El saco vitelino, conformado por células endodérmicas especializadas en el transporte selectivo de sustancias, se posiciona de manera de estar en contacto con la decidua materna. (Jollie y col 1990) El transporte se realiza a través de las células del saco, mediante ósmosis, difusión y transporte activo. Dichas células están especializadas en el transporte, síntesis y almacenamiento transitorio de sustancias y macromoléculas que se liberan al celoma embrionario. (Pratten y col 1997) Posteriormente una vez

establecida la vasculatura vitelina, la nutrición y oxigenación se realizará a través de la circulación vitelina. Numerosos estudios señalan la importancia de la correcta angiogénesis vitelina; existen agentes teratógenos que afectan este proceso y condicionan el desarrollo embrionario. (Nath y col 2004) El saco vitelino será funcional hasta que lo reemplace la placenta. La prevalencia de la función del saco vitelino depende de la especie. En la rata, el reemplazo ocurre a mediados de la preñez y en humanos a fines del primer trimestre de embarazo. (Docherty y col 1996)

Una vez establecida la placenta, el embrión en desarrollo se nutre y respira a través de la circulación materno-fetal. La sangre oxigenada y rica en nutrientes llega al embrión por la vena umbilical, provee al mismo y luego retorna por las arterias umbilicales a la circulación materna. A partir de la placentación se establece un nuevo órgano que provee alimento, oxígeno y es una barrera de protección frente al sistema inmune materno, microorganismos infecciosos y potenciales teratógenos.

La placenta de rata: estructura y función

A partir del evento implantatorio el trofoblasto invade la decidua materna penetrando la pared uterina. En este proceso intervienen mecanismos de migración, fusión y endoreduplicación. En la rata estos procesos dan lugar a la formación de vellosidades cubiertas de trofoblastos (trofoblastos de la vellosidad), que penetran en la pared uterina creando ramificaciones y formando de esta manera el laberinto. Algunos trofoblastos se separan de la vellosidad (trofoblastos extra-vellosidad) e invaden endometrio y miometrio únicamente de manera intersticial. Esta invasión abre espacios en la pared uterina, donde los sinusoides arteriales maternos vuelcan su contenido una vez establecida e iniciada la función placentaria. En la rata la placenta comienza a ser funcional a partir del día 12-13 de preñez y la nutrición, hasta ese momento histotrófica, pasa a ser hemotrófica. Los espacios abiertos son los lugares donde se establecerá el transporte de nutrientes y sustancias entre la circulación materna y la fetal.

La placenta madura de rata consta de diversas regiones: (Esquema B)

Hacia la cara fetal se encuentra la **placa coriónica o placa basal**, formada por tejido conectivo derivado del corion, por dentro de la misma corren las venas y arterias fetales de forma radial, encontrándose en una sola vena y dos arterias fetales en el cordón umbilical. Estas venas y arterias radiales emiten prolongaciones por dentro de las vellosidades que forman la más abundante región placentaria: **El laberinto**. Éste está compuesto por las vellosidades que no tienen un final ciego, sino

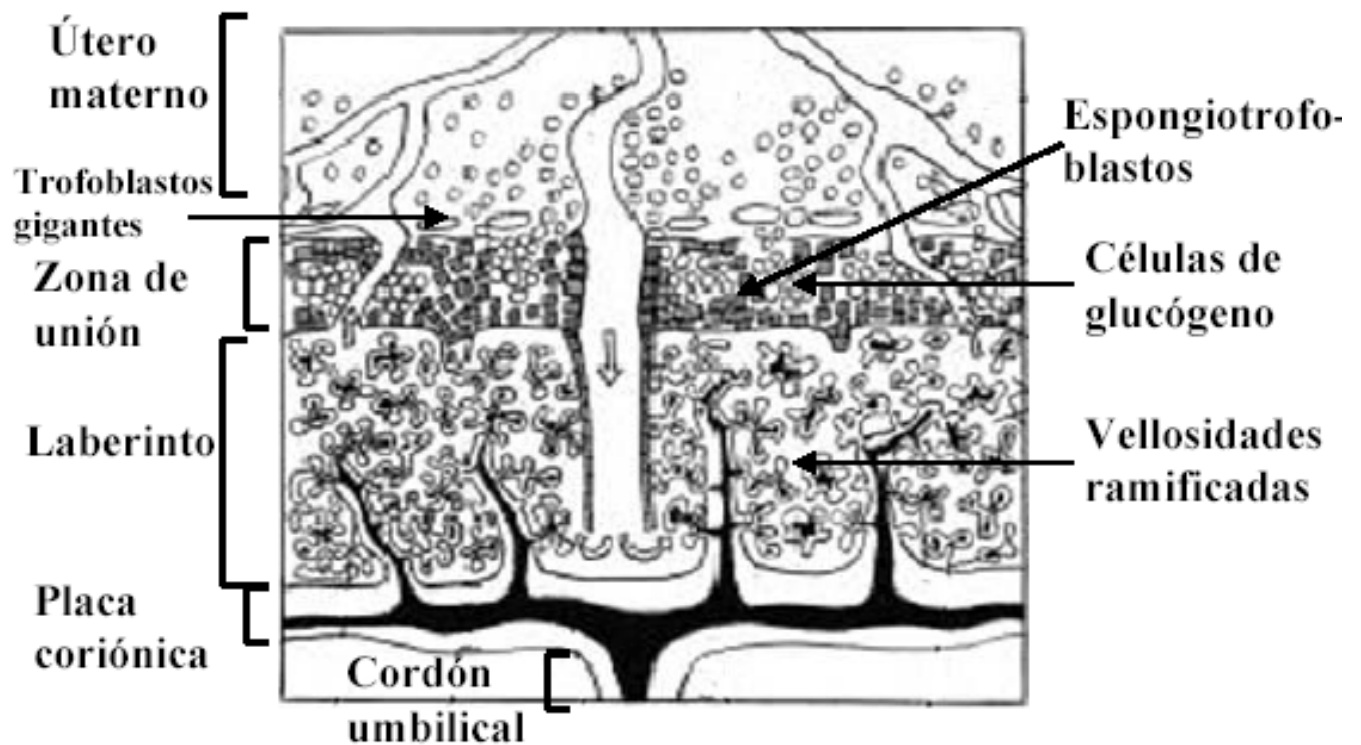
que se ramifican en forma similar a un laberinto. Se considera a la placenta de rata más eficiente que la humana debido a la forma laberíntica que adquieren sus vellosidades, lo que las hace tener más superficie de contacto, disminuyendo el espacio intervellosidad para aprovecharlo al máximo. Cada vellosidad está compuesta por tres capas celulares (**placenta tricorial**) que envuelven a las arterias y venas fetales y que están en contacto con la sangre materna volcada a los espacios abiertos durante la invasión trofoblástica. La primera monocapa celular, que está en contacto con la sangre materna, es de citotrofbastos mononucleares y si bien no tienen especializaciones de la membrana plasmática como microvellosidades, forman canales por donde la sangre materna entra hasta la segunda y tercer capa. Estas dos monocapas son sinciciales y poseen comunicación entre ambas mediante uniones estrechas que las relacionan. Por otra parte la capa sincicial intermedia posee invaginaciones en la membrana que está en contacto con la capa citotrofbástica. Ahí se crean espacios donde la sangre materna entra en contacto con la capa sincicial, produciendo un fenómeno de *stasis* que favorece el intercambio. El pasaje de nutrientes, el intercambio de gases y sustancias se realiza en las ramificaciones más delgadas puesto que es ahí donde el endotelio de venas y arterias fetales es más permeable, debido a la delgadez de la pared endotelial y a la presencia de poros. Las vellosidades principales contienen venas y arterias rodeadas de musculatura lisa, no hay transporte de sustancias a través de las mismas sino que su principal rol es el de sostén de las vellosidades.

A continuación del laberinto se ubica la **zona de unión**, una región de citotrofbastos especializados en producción hormonal y en reserva de glucógeno. Esta zona contiene células trofoblásticas mononucleares que se distinguen de acuerdo a su contenido de glucógeno en células de glucógeno y espongiotrofbastos. Las primeras se organizan en agrupaciones tipo “clusters” y contienen una gran cantidad de glucógeno. Los segundos no están organizados de forma particular y se especializan aparentemente en la producción hormonal. Por último se encuentra una región rica en **trofbastos gigantes**, generalmente multinucleados por endoreduplicación, poseen actividad invasiva constante hasta el final de la gesta. (Georgiades y col 2003)

La función placentaria es de sostén mecánico, nutrición, oxigenación y protección embrionaria. Asimismo la placenta secreta algunas de las hormonas necesarias para el mantenimiento de la preñez. Si bien en la preñez murina, se detecta expresión de las enzimas que participan de la esteroidogénesis placentaria, (Schiff y col 1993) la principal síntesis de estrógenos y progesterona la realiza el cuerpo lúteo. (Malassiné y col 2003) Hasta mediados de la gesta es la hipófisis la que secreta prolactina para sostener la función endocrina del cuerpo lúteo y así mantener la función ovárica, pero luego es la

placenta la que sintetiza y secreta las hormonas tipo prolactina para estimular dicha función. Desde el principio de la gesta murina se sintetiza la hormona lactógeno placentaria I y hacia mediados de la gesta se empieza a sintetizar la hormona lactógeno placentaria II, cuyos niveles se mantienen elevados hasta el final de la preñez. Estas dos hormonas, uniéndose a los mismos receptores que la prolactina, mantienen la función esteroidogénica del cuerpo lúteo. (Galosy y col 1995)

Placenta de rata



Esquema B: Estructura de la placenta de rata

La placenta humana: estructura y función

En un proceso similar al que se lleva a cabo en la placentogénesis murina, en el humano la pared uterina es invadida por los trofoblastos fetales, abriendo espacios donde se volcará la sangre materna y se realizará el intercambio materno-fetal. La nutrición hemotrófica humana se establece hacia fines del primer trimestre. Antes de esta etapa, tapones trofoblásticos previenen el contacto con la sangre materna, impidiendo así que al feto le llegue un exceso de oxígeno. La invasión de la pared uterina es llevada a cabo por dos tipos de trofoblastos: los **trofoblastos de la vellosidad** y los **trofoblastos extra-vellosidad**. Los primeros permanecen rodeando la estructura y posteriormente se fusionan formando una monocapa sincicial. Los trofoblastos extra-vellosidad son los que se separan de las vellosidades invadiendo la decidua materna y fusionándose también, pero no para formar una monocapa sino para diferenciarse en trofoblastos gigantes multinucleados. (Lyll 2002) Las vías de invasión de trofoblasto humano son: la intersticial, donde los trofoblastos invaden el estroma uterino, y la endotelial donde los trofoblastos invaden las arterias espiraladas reemplazando células endoteliales y musculares. (Kaufmann y col 2003)

La placenta humana (Esquema C) consta de una **placa basal o coriónica** similar a la que presenta la placenta de rata en la que arterias y venas radiales fetales se congregan en el cordón umbilical y emiten sus proyecciones por dentro de las vellosidades. Seguidamente se halla la **placenta fetal**, análoga al laberinto murino, formada por vellosidades troncales que se ramifican limitadamente formando las vellosidades terminales, dándole el aspecto de árbol vellosa. Si bien esta estructura en forma de árbol no es tan eficiente como el laberinto, las vellosidades de la placenta humana facilitan el transporte dada la presencia de una sola capa sincicial en lugar de tres, estableciendo así la placenta **hemomonocorial**. Las vellosidades están rodeadas por una capa sincicial que está en contacto con la sangre materna y que presenta microvellosidades en la membrana plasmática aumentando así su superficie de intercambio. Dicho intercambio se realiza en las vellosidades terminales, donde las paredes arteriales y venosas son más delgadas.

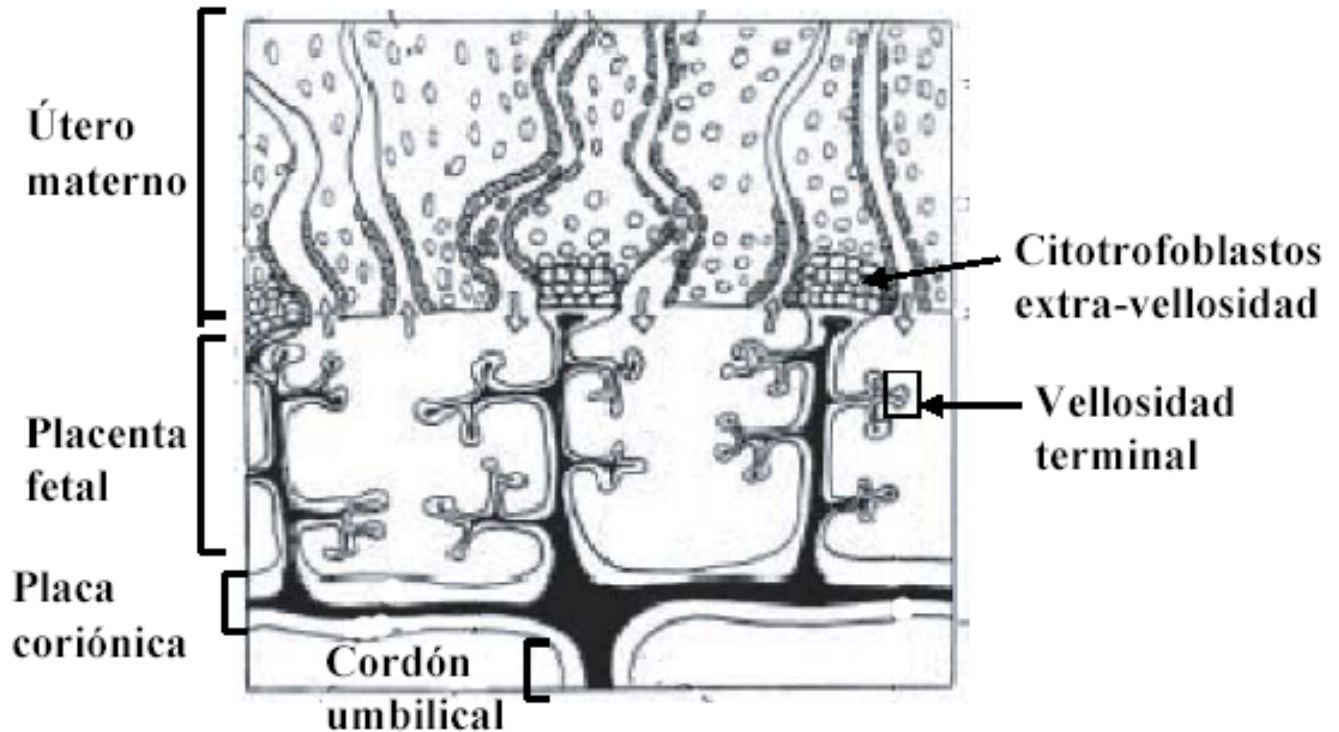
No existe en la placenta humana un análogo a la zona de unión de la placenta de rata, con células de glucógeno y espongiotrofoblastos, sino que la decidua materna está invadida por columnas de citotrofoblastos que se corresponden con las vellosidades terminales. Asimismo, el tejido decidual materno se encuentra invadido por trofoblastos gigantes multinucleados.

Por último se visualiza el miometrio, donde se encuentran las arterias maternas espiraladas, las que también son invadidas por trofoblastos.

Durante las primeras ocho semanas de preñez, previo al establecimiento de la placenta, la función del cuerpo lúteo es mantenida por la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) producida por el embrión desde los primeros días del embarazo. (Jameson y col 1993) La hCG, sintetizada y secretada por la membrana apical del trofoblasto hacia la sangre materna, mantiene la función esteroideogénica luteal. A partir de la semana ocho de gesta la función endocrina se realiza en la placenta. (Albrecht 1990) El sinciotrofoblasto tiene receptores para hCG (Licht y col 1993) y la unión a los mismos de la hormona desencadena eventos que determinan la regulación autocrina y paracrina de la diferenciación trofoblástica. Los citotrofoblastos se fusionan formando sincicios, evento inducido por hCG. Una vez diferenciados a sinciciales, los trofoblastos incrementan su producción hormonal, tanto de hormonas esteroideas como de hormonas peptídicas. Es característica del trofoblasto sincicial la producción incrementada de progesterona, estrógenos, hCG, lactógeno placentario humano y leptina entre otras. (Malassiné y col 2003)

El tejido placentario está especializado con el fin de proveer al feto de los nutrientes y oxígeno necesarios para su crecimiento y desarrollo. La glucosa es transportada al feto mediante transportadores específicos situados en la membrana trofoblástica. (Baumann y col 2002) Estos transportadores son en general glucosa-dependientes e independientes de insulina. (Barros y col 1995) La mayoría de la glucosa que llega a la circulación placentaria se transfiere al feto, siendo ésta la principal fuente de nutrición placentaria y fetal. Si bien la glucosa que no es transportada al feto en desarrollo, puede incorporarse a lípidos y glucógeno en la placenta, el 80 % de la glucosa que permanece en este órgano es metabolizada a lactato. Debido a la ineficiencia de la respiración anaeróbica para generar energía, son muchas las moléculas de glucosa que la placenta necesita. Una vez producido el lactato, éste se transporta al feto, que lo utiliza para su crecimiento. En la placenta se detectan actividades enzimáticas correspondientes a la vía de glucólisis, vía de las pentosas-fosfato y gluconeogénesis. (Diamant y Shafrir 1978) Si bien existe actividad enzimática relacionada con la gluconeogénesis, esta actividad es mínima y no se detecta actividad glucosa 6-fosfatasa. Este hecho, junto con la débil actividad de la enzima limitante fosfoenol piruvato carboxilasa cuestionan la formación placentaria de glucosa. (Barash y col 1991) Dada la relevancia del metabolismo lipídico placentario en este trabajo de tesis, y las características del mismo se detallarán en un capítulo posterior.

Placenta humana



Esquema C: Estructura de la placenta humana

DIABETES MELLITUS

La patología diabética se ha convertido en uno de los desafíos más profundos de la salud pública en el mundo. Su prevalencia se incrementa rápidamente, y las complicaciones asociadas con esta enfermedad se imponen como una pesada carga social en los sistemas de cuidado de salud y en la calidad de vida de los pacientes y sus familiares. Según un comunicado de la Organización Mundial de la Salud del año 1995 actualmente hay cerca de 143 millones de personas con diabetes en todo el mundo. Está previsto que esta cifra se eleve a 300 millones para el año 2025. Está ampliamente demostrado que el costo humano y económico de la diabetes se podría reducir notablemente si se invirtiera en prevención, sobre todo en el diagnóstico temprano, para evitar la aparición de

complicaciones. Estas cifras abarcan los dos grandes grupos en los que se clasifican los individuos diabéticos, de acuerdo a su etiología: Diabetes tipo 1 y Diabetes tipo 2.

Diabetes tipo 1:

Se caracteriza por la destrucción de las células β pancreáticas producto de una reacción autoinmune. Dicha autoinmunidad se desencadena por factores ambientales como diversos virus en sujetos genéticamente predispuestos a la enfermedad. La susceptibilidad génica se localiza en el cromosoma seis, en el locus para los genes que conforman el complejo mayor de histocompatibilidad. Los alelos considerados marcadores de la enfermedad son los denominados HLA DRs. (Zonana y col 1976) Un estado de pre-diabetes precede al desencadenamiento de la enfermedad, en este período comenzarían a observarse anticuerpos contra proteínas citoplasmáticas de las células β , entre ellas la insulina. (Srikanta y col 1986) Seguidamente a la respuesta humoral sobreviene la celular, las células β presentan el antígeno y los linfocitos T las reconocen y destruyen. En este proceso autoinmune ocurre una reacción inflamatoria en la que intervienen sustancias vasoactivas y citoquinas que cooperan en la destrucción de los islotes mediante la formación de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno que causan daño celular. (Pukel y col 1988, González y col 2001b) La consecuencia final de este proceso autoinmune es la secreción nula o insuficiente de insulina. Es por esta razón que el tratamiento de estos pacientes es la administración de insulina exógena, cuyas cantidades dependen de los requerimientos individuales.

Diabetes tipo 2:

Existen factores hereditarios en el desencadenamiento de la diabetes tipo 2, pero se desconoce su origen. Se cree que la susceptibilidad es multigénica y que el factor ambiental es determinante. La obesidad, los hábitos alimentarios, la actividad física, la edad y el estrés son considerados factores de riesgo para el desencadenamiento de la enfermedad. (Efendic y col 1984, Surwitt y col 1988, Klein y col 2004) Recientemente se ha postulado que una programación intrauterina anormal, determinada por la diabetes materna, podría ocasionar una estructuración anómala de los núcleos hipotalámicos fetales,

lo cual condicionaría a su vez la aparición de alteraciones cardiovasculares y metabólicas, incluida la diabetes tipo 2, en la vida futura del neonato. (Aerts y col 2003)

Los pacientes que sufren este tipo de diabetes no requieren de tratamiento con insulina, al menos en las primeras etapas de la enfermedad, y por ello se la conoce como Diabetes Mellitus no insulino dependiente.

En períodos iniciales de esta patología, se manifiesta una incapacidad para satisfacer la demanda insulínica. Los pacientes presentan curvas de tolerancia a la glucosa anómalas, que señalan la incapacidad del páncreas para responder al estrés metabólico de sobrecarga. En otros casos la glucosa induce la producción pancreática de insulina pero ésta no disminuye la glucemia, señalando una resistencia periférica a la hormona. (Ward y col 1984) La insulino-resistencia de los tejidos periféricos contribuye con la hiperglucemia general impidiendo la utilización de glucosa. (Calvillán y col 1991) Otra característica de la diabetes tipo 2 es la falta de capacidad de potenciación del efecto de glucosa frente al estímulo hormonal, neurohormonal u otros secretagogos. (Pfeifer y col 1981) Los mecanismos intracelulares que pueden estar dañados dando lugar a este tipo de diabetes son múltiples y entre ellos podemos citar: disminución de la afinidad de la unión insulina-receptor, alteración de la actividad quinasa intrínseca del receptor, defectos en la insulina o en el mecanismo de secreción, disminución de la cantidad de receptores de glucosa insulino-dependientes disponibles e incapacidad de los receptores de glucosa pancreáticos para disparar la respuesta insulínica. (Comi y col 1987, Brillon y col 1989, Arner y col 1991, Unger y col 1985)

La intolerancia inicial a la glucosa e insulino resistencia características de las primeras etapas de esta patología prosigue generando un deterioro tisular que agrava el cuadro. Los niveles elevados de glucosa plasmática inducen la producción de especies reactivas del oxígeno que a su vez generan daño tisular. La insulina es una hormona anabólica, su ausencia determina un aumento del catabolismo y una disminución del anabolismo. La disminución de la biodisponibilidad de insulina y de glucosa produce un aumento de la gluconeogénesis en detrimento de la glucogenogénesis hepática, aumentando la hiperglucemia. (Efendic y col 1985) El aumento en las concentraciones circulantes de glucosa, la incapacidad de utilización de la misma como fuente de energía y la falta de insulina inducen la lipólisis hepática y la liberación de ácidos grasos a circulación (Bonadonna y col 1991). Esta hiperlipidemia produce una anomalía en el funcionamiento mitocondrial del ciclo de los ácidos tricarbónicos que a su vez inhibe la producción de insulina. (Boucher y col 2004) Los ácidos grasos de cadena larga libres en el citosol, impiden la traslocación de los receptores de glucosa a la membrana

plasmática, con la consecuente inhibición de la captación de la glucosa plasmática en tejidos periféricos. (Mc Garry y col 2002) Por otra parte, un aumento de los ácidos grasos libres citoplasmáticos en las células β son posibles activadores de procesos apoptóticos mediados por ceramidas y por óxido nítrico, contribuyendo a la destrucción pancreática. (Unger y col 2001) Se ha postulado que la leptina interviene promoviendo la esterificación de ácidos grasos libres y el direccionamiento de los mismos a las células adipocitarias mejorando el funcionamiento y previniendo la acumulación lipídica en las células β . (Wang y col 1998)

Diabetes gestacional

La diabetes gestacional es aquella diagnosticada por primera vez durante el embarazo. Un 4% de las mujeres embarazadas desarrollan esta patología. En la gesta normal las hormonas placentarias exacerbaban la síntesis pancreática de insulina y la resistencia periférica a la insulina necesarias para garantizar la glucosa requerida por el feto en desarrollo. En la diabetes gestacional el páncreas no puede satisfacer el nuevo requerimiento y se desencadena la enfermedad, que cursa con hiperglucemia e intolerancia a la glucosa. (Freinkel y col 1985) La respuesta insulínica es diferente para cada paciente presentándose diferentes niveles de glucemia post prandiales, y por lo tanto debe adecuarse en forma individual el tratamiento indicado, ya sea insulínico o dietario. En general, este tipo de diabetes no cursa con elevados niveles de cuerpos cetónicos.

En la mayoría de los casos la alteración metabólica desaparece después del parto. Sin embargo un alto porcentaje de mujeres desarrolla diabetes un tiempo después del parto, indicando una predisposición genética que se expresa durante el embarazo por la acción anti-insulínica de las hormonas placentarias. (Ryan y col 1988, Leturque y col 1989, Brelje y col 1993)

Modelos experimentales de diabetes

Existen diferentes modelos de diabetes, principalmente en rata o ratón, necesarios para estudiar en profundidad los distintos aspectos de esta patología. Los mismos pueden tener una base genética o ser generados por pancreatectomía sub-total o mediante la administración de drogas como el aloxano o la estreptozotocina. La administración de estreptozotocina en roedores constituye un modelo de diabetes

ampliamente utilizado. Esta droga es un antibiótico producido por la especie *Streptomyces Achromogenes* y tiene una estructura química semejante a la glucosa con un grupo metilnitroso unido al carbono 2. Esta estructura hace que la droga tenga una alta especificidad por las células β pancreáticas donde se une con alta afinidad a los transportadores de glucosa. Una vez dentro de la célula, la droga produce la metilación del ADN causando ruptura y alquilación, induciendo a la poliADP-ribosa-sintetasa, (enzima reparadora del ADN), que utiliza NAD^+ como cofactor consumiendo las reservas celulares. (Mc Neill 1999) Esta depleción junto con la formación de especies reactivas del oxígeno como NO , O_2^- y H_2O_2 producen el daño observado en células β pancreáticas induciendo su destrucción por degranulación y posterior necrosis. (Junod y col 1967, Orci y col 1968)

Para generar un modelo experimental de diabetes severa en la rata, se administra por vía intravenosa o intraperitoneal de 40 a 80 mg de estreptozotocina por Kg de peso. Esto genera la destrucción del páncreas endocrino y la consecuente disminución de la concentración plasmática de insulina, originando un cuadro de: hiperglucemia, cetonuria, hiperlipidemia, pérdida de peso, polifagia, polidipsia y poliuria, (Junod y col 1969, Sambandan y col 2000). La suplementación exógena de insulina resulta imprescindible para mantener con vida a estos animales un tiempo prolongado.

Para generar un modelo de diabetes moderada se administra estreptozotocina por vía subcutánea en período neonatal, según el método desarrollado por Portha (Portha y col en 1979). Esta estrategia se basa en la capacidad del páncreas neonatal para recuperarse por regeneración parcial a partir de células pancreáticas indiferenciadas. Esta particularidad permite el desarrollo de un modelo experimental de diabetes moderada, con animales que presentan niveles de glucemia ligeramente elevados, intolerancia a la glucosa y disminución de la respuesta insulínica frente a una sobrecarga de glucosa. El desarrollo de este modelo es útil y frecuente, ya que los valores de glucemias y el grado de intolerancia a la glucosa son semejantes a los que frecuentemente se observan en la mujer diabética gestante, incluso bajo tratamiento insulínico y/o dietario.

DIABETES Y PREÑEZ

Adaptaciones metabólicas en la gestante sana y diabética

La preñez induce cambios metabólicos necesarios para satisfacer las necesidades del embrión en desarrollo (Freinkel y col 1980). Estos cambios son el resultado de la acción de las hormonas producidas durante la gesta: hCG, lactógeno placentaria (LP), prolactina, progesterona, estrógenos y cortisol.

Durante la primer parte de la preñez prevalecen los procesos anabólicos, aumentando las reservas maternas para abastecer los altos requerimientos que tendrá el embrión en desarrollo durante la gesta. Posteriormente ocurren eventos que tienden a hacer prevalecer el estado catabólico materno, lo que redundará en una amplia biodisponibilidad de sustratos energéticos en la etapa de mayor crecimiento fetal. (Herrera y col 1987)

Tanto en la rata como en humanos se induce un estado de resistencia periférica a la insulina y a la vez un aumento de la síntesis pancreática de insulina. La resistencia a la acción de la insulina está dada en parte por el efecto de las hormonas de la preñez sobre la actividad quinasa del receptor de insulina, inhibiendo su fosforilación, así como la de otros sustratos de quinasas. De esta manera se alteran las vías de síntesis y degradación de lípidos, proteínas e hidratos de carbono con el objeto de incrementar la disponibilidad de sustratos a ser transportados al feto en desarrollo. (Buchanan y col 1991)

El incremento en los niveles de progesterona es responsable, en parte, de la hiperinsulinemia, hiperfagia e hipertrofia de los islotes pancreáticos, del aumento en la deposición de lípidos en adipocitos y glándulas mamarias y de la disminución de la síntesis de glucógeno en adipocitos y músculo durante las primeras etapas del embarazo, mientras que hacia el final de la gesta prepara a las glándulas mamarias para la producción de leche. (Kalkhoff 1982) Por otra parte se ha demostrado que en las ratas preñadas existe una disminución del transporte de hexosas y una inhibición de la síntesis del glucógeno muscular debido al aumento de las concentraciones plasmáticas de progesterona. (Leturque y col 1989) Los niveles elevados de estrógenos activan durante la gestación las vías de síntesis de glucosa y son inhibidores de las enzimas limitantes del ciclo de los ácidos tricarbónicos en el hígado de rata preñada. (Diamant y col 1975b)

En la placenta humana la gonadotrofina coriónica (hCG) es producida por los citotrofoblastos y su expresión aumenta cuando éstos se diferencian a trofoblastos sincitiales. (Merz y col 1994, Hoshina y

col 1983) Si bien su principal función es la regulación de la producción hormonal, tiene algunos efectos sobre el metabolismo placentario, estimulando la glucogenolisis y la glucólisis placentaria. (Demers y col 1973, Diamant y col 1975 b, Ryan y col 1988)

La hormona lactógeno placentaria, producida durante la gestación humana y murina, favorece la producción pancreática de insulina, (Brelje y col 1993) induce insulino resistencia, y en consecuencia favorece la gluconeogénesis e inhibe la glucogenogénesis en tejido muscular, estimulando la lipólisis en tejido adiposo (Ryan y col 1988)

Estos cambios hormonales inducidos por la gestación producen un estado metabólico orientado a proveer al feto de nutrientes, ampliar la biodisponibilidad de glucosa y preparar el cuerpo materno para las últimas etapas de la gestación y el período de lactancia.

El embarazo en la diabetes induce anomalías en el desarrollo embrionario, observándose incrementos en los índices de abortos espontáneos, anomalías congénitas, distrés respiratorio e hipoglucemia neonatal entre otras. (Kitzmilller y col 1978, Mills y col 1979, Martínez-Frías 1998) Considerando que la patología diabética presenta insulino resistencia, hiperglucemia, e hiperlipidemia, durante la gesta diabética se produce una exacerbación de las características mencionadas debido al efecto anti-insulínico de las hormonas de la preñez. La insulino resistencia de los tejidos periféricos aumenta la demanda de insulina y en muchos casos el tratamiento con insulina se suma al tratamiento dietario para contrarrestar la hiperlipidemia y la hiperglucemia. Hacia el final de la preñez se favorecen los mecanismos de producción de cetonas y oxidación de lípidos, y por lo tanto si la insulina no es suficiente, podrá producirse cetoacidosis, peligrosa para la gestante y el embrión en desarrollo.

Asimismo, existen alteraciones en la producción hormonal inducidas por la diabetes. (Tesone y col 1983, Ladenheim y col 1984) Si bien existen datos controversiales acerca de la producción hormonal en la preñez de madre diabética, se sabe que, debido a la hiperglucemia, la insuficiencia insulínica y las anomalías metabólicas que acarrea, tanto la esteroidogénesis como la síntesis de hormonas peptídicas está alterada. (Belleville y col 1979, Camus-Bablon 1990)

Cabe destacar que en la gesta diabética el estrés oxidativo generado por la hiperglucemia, junto con las anomalías hormonales, sumadas a las metabólicas y al desequilibrio de sustancias vasoactivas son todos mecanismos involucrados en las múltiples anomalías inducidas por esta patología que se observan en el curso de la preñez humana y en los modelos experimentales de diabetes. (Eriksson y col 2003, Jawerbaum y col 2005 a y b)

Diabetes en la organogénesis temprana

En la gestante diabética está incrementado el riesgo de abortos espontáneos, malformaciones congénitas, alteraciones en el proceso de maduración pulmonar, hipoglucemia neonatal y macrosomía, entre otras. La hiperglucemia, junto con la hiperlipidemia y la producción incrementada de cuerpos cetónicos son teratógenos cuyos mecanismos aún no han sido del todo detallados. (Sadler y col 1988, Jawerbaum y col 2005 a) La incidencia de estas anomalías embrionarias disminuyen con el tratamiento insulínico, si bien no se ha logrado aún revertirlas completamente. Es por esto que el buen control glucémico antes y durante el embarazo son fundamentales para el correcto desarrollo del embrión. (Banerjee y col 2004) Freinkel, propuso en 1980 el término “teratogénesis mediada por el combustible”, describiendo aquella anomalía que se produce en la gestante diabética debido a la insuficiencia insulínica y que da lugar, hiperglucemia mediante, a malformaciones embrionarias. Las anomalías congénitas constituyen la principal causa de muerte fetal en esta patología. (Martínez-Frías y col 1998, Mills y col 1979) Las principales malformaciones inducidas por la diabetes son el resultado de alteraciones durante el cierre del tubo neural, que desencadena patologías como la espina bífida, diversos grados de anencefalia, así como otras alteraciones en el desarrollo y función del sistema nervioso central. Asimismo son importantes las fallas en el desarrollo cardíaco, en la formación de la mandíbula y maxilar y otras dismorfogénesis del esqueleto. (Molin y col 2004, Styrd y col 1995, Reece y col 1985)

La utilización de modelos experimentales de diabetes en animales se hace imprescindible para el estudio de los mecanismos involucrados en los procesos teratogénicos. Es de destacar que la similitud de las anomalías embrionarias generadas en los modelos experimentales de diabetes, principalmente las alteraciones a nivel neural y cardíaco, son semejantes a las observadas en hijos de madre diabética, indicando la utilidad de estos modelos para este tipo de estudio. (Eriksson y col 2003)

Se ha demostrado mediante cultivo de embriones de animales sanos durante la organogénesis embrionaria temprana que tanto el suero de rata diabética como la hiperglucemia inducen la aparición de anomalías embrionarias. (Sadler y col 1988, Wentzel y col 2002, Reece y col 1996, Ornoy y col 1999, Jawerbaum y col 2000) Se desconocen aún en profundidad los mecanismos moleculares que inducen las anomalías embrionarias en la diabetes, sin embargo, diversos trabajos apuntan a la hiperglucemia como principal teratógeno implicado en estos mecanismos (Jawerbaum y col 2005 a, Eriksson y col 2003). El entorno hiperglucémico, genera una elevación en las concentraciones de las

especies reactivas del oxígeno y altera los niveles de enzimas antioxidantes, lo que determina el estrés oxidativo que caracteriza a la diabetes, (Giugliano y col 1996) y que se evidencia en el embrión de madre diabética (Wentzel y col 1999, Pustovrh y col 2005 b) Se ha comprobado que el agregado de antioxidantes al medio de cultivo de embriones en condiciones de hiperglucemia disminuye la incidencia de malformaciones. (Wentzel y col 1998, Eriksson y col 1996) Por otra parte, en embriones pre-implantatorios, la hiperglucemia provoca la apoptosis de células del blastocisto, particularmente de aquellas pertenecientes a la masa interna celular. (Moley y col 2001, Chi y col 2002) Se evidencia también daño apoptótico en el embrión durante la etapa de organogénesis temprana. (Fine y col 1999)

Asimismo, la diabetes induce un aumento en las concentraciones plasmáticas de lípidos, que se traduciría en un mayor pasaje de lípidos al embrión en desarrollo. Durante las primeras etapas del desarrollo la nutrición se efectúa a través del saco vitelino y la difusión, y el transporte facilitado parece ser el principal mecanismo. (Jollie y col 1990) El entorno diabético induce anomalías en la composición de la membrana plasmática y en el transporte de sustancias a través de la misma. (Jawerbaum y col 2000, Shubert y col 1996) Se ha comprobado que existen anomalías en los niveles y composición de lípidos del saco vitelino en modelos experimentales de diabetes y en embriones cultivados en condiciones de hiperglucemia, donde se incrementan los ácidos grasos y los triglicéridos presentes en el saco vitelino y también se modifican las concentraciones relativas de los ácidos grasos que componen los triglicéridos y fosfolípidos (Pinter y col 1988). El agregado *in vitro* de algunos de los metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandina E2 y 15 deoxy delta¹²⁻¹⁴prostaglandina J2) disminuyen las anomalías causadas por la diabetes y mejoran los desbalances del metabolismo lipídico y nitridérgico inducidas por esta patología (Jawerbaum y col 2002, Sinner y col 2003).

En síntesis, las alteraciones presentes en el entorno diabético materno generan anomalías de transporte, composición, acumulación y metabolismo de sustratos energéticos y de componentes embrionarios, así como de moléculas señalizadoras, agentes vasoactivos y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Todo esto contribuye y forma parte de la mencionada “teratogénesis mediada por el combustible” que junto con las anomalías morfológicas que se desencadenan, se denomina en la actualidad “embriopatía diabética”.

Si bien el período de organogénesis temprana es el de mayor susceptibilidad a la inducción de malformaciones congénitas, las anomalías inducidas por la diabetes luego de la placentación dan lugar también a alteraciones, más sutiles, pero que estarán vinculadas al distress respiratorio fetal y la macrosomía, y que podrán comprometer la génesis de órganos como el páncreas e hipófisis, dando

origen a enfermedades que se presentarán en la vida adulta del hijo de madre diabética como la obesidad, la intolerancia a la glucosa y la diabetes (Aerts y col 2003). Estas alteraciones serán evidentes tanto en las mujeres con diabetes pre-gestacional, como en aquellas con diabetes gestacional, que se induce hacia mediados de la preñez.

Al establecerse la función placentaria, la nutrición histotrófica deja lugar a la hemotrófica, proceso más controlado y eficiente, ya que la placenta regula el pasaje de nutrientes y establece una barrera frente a las condiciones maternas nocivas para el feto (toxinas, bacterias, virus, sistema inmune materno, etc.). Anomalías en la estructura y función placentaria en la diabetes serán de importancia en las alteraciones en el desarrollo y crecimiento fetal inducidas en esta patología.

La placenta de rata diabética

Se ha descrito un aumento del tamaño y del contenido de glucógeno en las placentas de rata diabética (Shafrir y col 1991) Un estudio minucioso y microscópico de la estructura de la placenta de rata revela un aumento en el grosor de las tres capas trofoblásticas de las vellosidades. Estas células presentan además una mayor vesiculización y vacuolización de su contenido. Los trofoblastos del laberinto de la placenta de rata diabética contienen altos niveles de glucógeno y tienen apariencia esponjiforme con alto porcentaje de mesénquima fetal y fibrosis perivascular. Se ha descrito la presencia de numerosos gránulos de secreción en el citoplasma de los trofoblastos. En la zona de unión se observa un aumento en el número de células conteniendo glucógeno, que en algunos casos degeneran dejando “cistos” o sacos vacíos, rodeados de membrana plasmática. Los espongiotrofoblastos presentan también gran vacuolización, un gran número de lisosomas y cuerpos mielínicos. La zona basal de la placenta de rata diabética muestra una mayor cantidad de trofoblastos gigantes con inclusiones nucleares y fibrinoides citoplasmáticos. (Gewolb y col 1986)

Las anomalías estructurales descriptas alteran el normal funcionamiento de la placenta. El transporte de nutrientes se dificulta debido a la disminución del volumen de sangre materna que entra en la placenta, el aumento en el espesor de las capas trofoblásticas y la fibrosis de los capilares. La distancia que debe cubrir el proceso de transporte bilateral aumenta, y probablemente por esta causa se observa una disminución en el flujo sanguíneo placentario. (Eriksson y col 1984) Esta disminución compromete el normal desarrollo fetal, observándose en muchos casos un significativo retraso de crecimiento. Si bien el tratamiento con

insulina disminuye la frecuencia de aparición de anomalías placentarias, no las elimina por completo. (Padmanabhan y col 2001)

La placentomegalia podría ser una adaptación tendiente a aumentar la superficie de intercambio, para compensar la disminución del flujo sanguíneo, y por lo tanto, disminución del transporte de nutrientes y oxígeno. Cabe destacar que a pesar de esta reducción en el flujo de nutrientes, es claro el incremento en el transporte de glucosa hacia el feto en desarrollo, pasaje que se relaciona con la hiperglucemia materna, y que no depende, al menos en forma directa, de la insulina. (Testar y col 1985, Rankin y col 1986)

Por otra parte, la hiperglucemia estimularía la división mitótica, favoreciendo la proliferación en detrimento de la diferenciación trofoblástica. En efecto, el aumento de las células con glucógeno, del grosor trofoblástico y de las figuras mitóticas caracterizan la inmadurez placentaria inducida por la diabetes. (Gewolb y col 1986)

La placenta de paciente diabética

Múltiples estudios han evaluado las características morfológicas de la placenta en mujeres con Diabetes Mellitus, observándose importantes diferencias y grados de severidad en las anomalías encontradas. Sin embargo, es característico el aumento de tamaño placentario, atribuido a un incremento del parénquima, es decir, de todas las estructuras que están involucradas en el intercambio materno-fetal y en el metabolismo placentario. (Teasdale 1981, Teadsale 1983) Esta hiperplasia observada en vellosidades, capilares fetales, trofoblastos y espacios entre vellosidades, se corresponde con un aumento del contenido de ADN placentario. En las placentas de mujeres diabéticas se observa un incremento en el número de vellosidades inmaduras caracterizadas por un exceso de citotrofoblastos y una disminución de la vascularización fetal. Se observa un aumento de las figuras mitóticas señalando un incremento en la actividad proliferativa y crecimiento de las vellosidades terminales en detrimento de las troncales. La hiperglucemia provoca daño tisular, sin embargo, si bien se observa edema en el tejido placentario, en general éste no se caracteriza por la presencia de lesiones graves, como ocurre en el riñón o hígado diabético, probablemente debido a la naturaleza transitoria de la placenta. Un aumento de los componentes de la matriz extracelular determinan un engrosamiento de la membrana basal del sincitiotrofoblasto. Se observa un aumento en el contenido de colágeno, ácido hialurónico y heparán sulfato. (Nanaev y col 1991, Wasserman y col 1980) La ocurrencia de estas anomalías está relacionada con la severidad de la diabetes y con el grado de control metabólico. Existe una correlación directa entre la falta de control glucémico riguroso durante los dos primeros

trimestres de embarazo y la aparición de anomalías placentarias, señalando la importancia del control metabólico en las primeras etapas del embarazo y previas al mismo. (Bjork y col 1982)

Se ha observado glicosilación no enzimática de las proteínas situadas en la membrana apical de las vellosidades, sin embargo no se conoce si estos cambios alteran la función proteica. Una característica de las vellosidades de placenta diabética es el aumento en su tamaño y el de los capilares fetales, incrementando la superficie que ocupan. Este aumento del área de superficie de intercambio podría compensar el acortamiento de la distancia de difusión por el engrosamiento de la membrana basal. Esta anomalía en el tamaño de la vellosidad también se correlaciona con el control metabólico durante el primer y segundo trimestre de embarazo. (Bjork y col 1984)

En placenta humana se ha descrito la presencia de receptores de insulina en la membrana apical del sinciotrofoblasto, disminuyendo su densidad con el avance de la gesta, sin embargo no se evidenció unión de insulina iodinada en compartimentos intracitoplasmáticos. (Nelson y col 1978) A mediados de la gesta también se encuentran receptores de insulina en los capilares fetales, incrementándose a término. (Desoye y col 1994)

Los efectos placentarios de la insulina se relacionarían con el estímulo de la producción hormonal y el estímulo de la actividad proliferativa. (Nestler y col 1987, Mandl y col 2002) Se ha observado que en las placentas de mujeres diabéticas tratadas con insulina se halla aumentada la expresión de receptores a la hormona, y que las de mujeres diabéticas tratadas con dieta presentan una menor cantidad de receptores a insulina que las placentas de mujeres sanas. (Desoye y col 1992)

LÍPIDOS

Estructura y función

Los lípidos son moléculas de estructura diversa cuya característica en común es su insolubilidad en líquidos acuosos y la solubilidad en solventes orgánicos. Son componentes estructurales, sustratos para obtener energía, cofactores enzimáticos y moléculas de señalización inter e intra celular.

La insolubilidad en líquidos acuosos, otorga dificultad al transporte y movilización lipídica en los fluidos orgánicos. Diversas hormonas modulan la síntesis, transporte, destino y degradación de lípidos en función de la ingesta y las necesidades corporales.

Los lípidos pueden ser **simples o complejos** de acuerdo a la cantidad de grupos esterificados con potencialidad de hidrolización. Teniendo en cuenta la carga de la molécula, concepto que está implicado en la solubilidad en solventes acuosos, los lípidos se clasifican en **neutros y polares**.

Lípidos neutros:

Los **ácidos grasos** son cadenas hidrocarbonadas que poseen un grupo carboxilo en un extremo, presentan distintos grados de saturación y un número variado de átomos de carbono, que en los animales es siempre par. Pueden permanecer en forma libre, circular unidos a albúmina, o transportarse esterificados. Son componentes de otros lípidos cuya función estará estrechamente relacionada con la longitud y el grado de saturación de la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos constituyentes.

El organismo sintetiza la mayoría de los ácidos grasos, sin embargo algunos de ellos deben estar presentes en la dieta: son los ácidos grasos esenciales. Entre ellos existe un grupo que posee un alto grado de insaturación; estos son precursores de otros compuestos imprescindibles para el organismo. El ácido linoleico, el linolénico y el araquidónico son adquiridos en la dieta, si bien el araquidónico puede sintetizarse por elongación del linoleico. El ácido araquidónico es precursor de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos. El ácido araquidónico y sus derivados son esenciales e indispensables en la función reproductiva, en el mantenimiento de la preñez, en el desarrollo embrionario, en la función placentaria y en el desencadenamiento del parto. (Waltman y col 1978, Tulenko 1981, Jawerbaum y col 1996a, Jawerbaum y col 1996b, Goldman y col 1985)

Los **triglicéridos** están conformados por tres ácidos grasos esterificados a cada uno de los grupos hidroxilos del glicerol. Estos ácidos grasos pueden ser de distinto origen y naturaleza. La oxidación de los triglicéridos libera una gran cantidad de energía y por esta razón son considerados las reservas corporales por excelencia. Dada la naturaleza apolar de sus componentes se almacenan en gotas lipídicas intracelulares y se transportan mediante transportadores específicos en forma de lipoproteínas (HDL, VLDL y LDL).

El **colesterol** no presenta ácidos grasos en su composición. También es almacenado en gotas lipídicas y transportado formando parte de lipoproteínas transportadoras (HDL, VLDL y LDL). Su presencia otorga rigidez a las membranas biológicas, brindando soporte estructural a las mismas. La mayoría de las hormonas esteroideas lo utilizan como precursor, por lo que su disponibilidad y metabolismo es fundamental durante la gestación, tanto para la función placentaria como para el re-ordenamiento

metabólico que asegura el mantenimiento de la preñez y la nutrición fetal. En cuanto al desarrollo embrionario, el colesterol es indispensable para la formación del sistema nervioso (Minsker y col 1983, Repetto y col 1990), siendo asimismo necesario para la función del morfógeno Hedgehog, proteína indispensable durante los primeros estadios de la embriogénesis. (Porter y col 1996)

Los **ésteres de colesterol** se presentan como ácidos grasos esterificados a una molécula de colesterol. Los mismos son también componentes de membranas lipídicas, reservorios de ácidos grasos y de colesterol.

Lípidos polares:

Los componentes mayoritarios de las membranas biológicas son los **fosfolípidos**, estos lípidos se componen de una molécula de glicerol que esterifica dos ácidos grasos, y un ácido fosfórico que esterifica a otro compuesto, generalmente una base orgánica (colina, serina, inositol o etanolamina). De esta manera la fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina que conforman las bicapas lipídicas de las membranas celulares, se sitúan en la porción expuesta al citosol o al medio extracelular. De acuerdo a las cantidades relativas de estos fosfolípidos y de otros componentes se definirán las características y funciones de las membranas: fluidez, permeabilidad, potencial eléctrico, capacidad de transmitir señales y muchas otras. Los fosfolípidos de las membranas trofoblásticas, específicamente la fosfatidilserina, están involucrados en el proceso de fusión celular y formación de sincicios. (Adler y col 1995)

Lípidos y diabetes

La mayoría de los ácidos grasos se encuentran esterificados, ya que en su forma libre son insolubles y su incremento resulta nocivo para el organismo. En períodos de ayuno cuando la glucosa no es suficiente, o bien no se encuentra disponible como en los tejidos afectados por la diabetes, se promueve la utilización de lípidos como fuente de energía. La hidrólisis de triglicéridos y posterior liberación de ácidos grasos, están bajo estricto control hormonal. La lipasa de triglicéridos se activa por fosforilación AMPc dependiente. Por lo antedicho, las hormonas que actúan a través del AMPc activan la lipólisis. El glucagon y la adrenalina son algunas de las hormonas estimuladoras de esta vía. Por el contrario, la insulina tiene

una acción antilipolítica y lipogénica. Esta hormona disminuye la movilización de grasas y favorece la síntesis de triglicéridos, incrementando la entrada de la glucosa a la célula y su utilización como fuente de energía o almacenamiento. La insulina promueve la captación de glucosa por el tejido adiposo, favorece la síntesis de glicerol 3 fosfato, activa la enzima acetyl CoA oxidasa incrementando la formación de acetyl CoA, y promueve la vía de las pentosas fosfato, generando NADPH. Todos los eventos descriptos favorecen la lipogénesis. (Stryer 1988)

En la diabetes la relación insulina/glucagon está disminuida, alteración que favorece la movilización lipídica y el incremento en los niveles de ácidos grasos plasmáticos. Este incremento promueve a su vez la producción de cuerpos cetónicos a nivel hepático, cuyo aumento da lugar al coma cetoacidótico en los casos severos.

En los pacientes diabéticos y en algunos modelos experimentales de diabetes se observan altos niveles de ácidos grasos y de triglicéridos plasmáticos, así como alteraciones en las proteínas transportadoras. Esta última característica de la patología ha sido relacionada con el riesgo del advenimiento de enfermedades coronarias. (Haffner 1998)

En la diabetes está alterada no solo la cantidad, sino también la proporción de los distintos ácidos grasos, probablemente debido a las anomalías de algunas enzimas específicas de su síntesis. Se ha reportado una alteración en los niveles y en el metabolismo del ácido araquidónico, produciéndose un desbalance en la producción de sus metabolitos. (Harrison y col 1980, Halushka y col 1981, Jawerbaum y col 1995, González y col 2001b)

El metabolismo lipídico en la organogénesis temprana

El embrión es capaz de sintetizar lípidos neutros y polares desde el período preimplantatorio (Brewer y col 1993, Pratt 1982). Sin embargo, el gran requerimiento de los mismos dado el continuo crecimiento embrionario, hace que sea indispensable la transferencia de lípidos maternos. Las primeras etapas de desarrollo embrionario son histotróficas, y los lípidos se transfieren por simple difusión. Existe luego, durante la etapa de organogénesis temprana, una etapa intermedia entre la difusión simple y el establecimiento de la placenta, en la cual el saco vitelino regula el pasaje de lípidos y otras sustancias. En efecto, existe una importante captación de ácidos grasos e incorporación de los mismos a triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol en el área más vascularizada del saco vitelino. (Powell y col 2004) Asimismo, el saco vitelino expresa en su membrana apical receptores para lipoproteínas que captan

selectivamente los lípidos maternos, los hidrolizan y los re-esterifican en nuevas lipoproteínas conteniendo un alto grado de apolipoproteína B (VLDL o LDL). Estas lipoproteínas son liberadas al celoma embrionario en los primeros estadios de desarrollo, o bien a la circulación vitelina cuando ésta se halla establecida. Posteriormente los tejidos embrionarios captan las lipoproteínas mediante receptores específicos de membrana. (Farese y col 1998) Se ha observado que la deficiencia en la apolipoproteína B produce acumulación de triglicéridos, colesterol y ésteres en gotas lipídicas en el saco vitelino, con su consecuente engrosamiento y una deficiencia en el contenido de éstos lípidos en tejidos embrionarios. (Raabe y col 1998, Farese y col 1996) En cuanto a sus funciones, y tal como en otros tejidos, los ácidos grasos cumplen en el embrión roles esenciales en la señalización inter e intracelular, se ha observado que la palmitoilación de la proteína reguladora del crecimiento axonal en el sistema nervioso de ratones es esencial para su correcta funcionalidad. (Ueno 2000) Por otro lado, los ácidos grasos son también precursores de prostaglandinas y leucotrienos, los cuales son ligandos de receptores nucleares. (Chawla y col 2001)

Los triglicéridos son utilizados en la nutrición embrionaria desde los primeros estadios del desarrollo, y actúan también como reservorio de ácidos grasos. (Ferguson y col 1999)

La importancia de los fosfolípidos embrionarios reside en su rol como componentes mayoritarios de las nuevas células en formación. Su función es fundamental durante procesos como el desarrollo del sistema nervioso central, que implica un rápido crecimiento celular. En efecto, tanto la transferencia materna como la síntesis embrionaria de fosfolípidos son importantes para el normal desarrollo neural. En tal sentido, el requerimiento de colina es fundamental, y la deficiencia de fosfatidilcolina es la causa de numerosos trastornos en la neurulación (distención del neuroporo posterior, expansión de las vesículas cerebrales, hipoplasia craneofacial y defectos provenientes de anomalías en el cierre del tubo neural). (Fisher y col 2001)

El embrión recibe colesterol a través de la circulación materna, pero su propia síntesis es también importante. Su función es estructural, de señalización y también es precursor de hormonas esteroideas. La deficiencia de enzimas de la vía de síntesis de colesterol produce diversas anomalías en el desarrollo y acumulación de intermediarios de dicho camino sintético. En humanos, la inhibición o falta de una o varias enzimas de síntesis de colesterol como la 3 hidroximetilglutaril Co A reductasa, la delta-7 y la delta 24 reductasa causa una acumulación de intermediarios y una disminución en el contenido de colesterol relacionada con la aparición del síndrome Smith-Lemli-Opitz, caracterizado por malformaciones en el sistema nervioso central, en el corazón, y en las extremidades. (Wolf 1999) En

roedores, dicha deficiencia induce la falta de división del cerebro en dos hemisferios, afecta la formación de vértebras y del sistema digestivo. (Minsker y col 1983, Repetto y col 1990) La carencia de apolipoproteína B en los embriones con estas deficiencias, agrava las anomalías en el sistema nervioso central, indicando que tanto la síntesis endógena como el aporte materno de colesterol son necesarios para el desarrollo de dicho sistema. La síntesis endógena es indispensable para el correcto desarrollo del corazón, extremidades, vértebras y pared del tubo digestivo. (Farese y col 1998) Las proteínas Hedgehog son esenciales en la señalización y desarrollo del embrión temprano. El patrón de distribución espacial de la proteína Hedgehog de *Drosophila* y Sonic Hedgehog murina se atribuye a la modificación por el agregado de una molécula de colesterol por autocatálisis. La hidrofobicidad así conferida restringe el patrón de distribución, restricción necesaria para el correcto desarrollo embrionario. (Porter y col 1996)

El metabolismo lipídico en la placenta

Luego del período de organogénesis temprana, la placenta funcional mediará el transporte de lípidos al feto en desarrollo.

La naturaleza hemotricorial de la placenta murina condicionará una disminución en la velocidad de movilización de lípidos a través de la placenta, mientras que la placenta humana, de naturaleza hemomonocorial, verá optimizada dicha velocidad.

Los animales carecen de las enzimas necesarias para incorporar dobles enlaces más allá del carbono 9, de esta manera los ácidos grasos poliinsaturados son adquiridos en la dieta. El estudio de la incorporación al hígado fetal de ácidos grasos como el linoleico y linolénico, forzosamente obtenidos de la sangre materna, ha contribuido al estudio de la función de transporte lipídico a través de la placenta.

Los ácidos grasos libres o esterificados se encuentran unidos a proteínas transportadoras en la sangre materna. Se han identificado receptores para los ácidos grasos unidos a estas proteínas en placenta de rata y en placenta humana. (Brandes y col 1987, Das y col 1988, Das y col 1993) Estos receptores específicos contribuyen a que los ácidos grasos maternos sean captados por la placenta y a que exista una captación diferencial de los distintos ácidos grasos, favoreciéndose aquellos de cadena más larga. (Campbell y col 1996) Los ácidos grasos son luego sometidos a distintos procesos: desaturación, elongación, esterificación y oxidación. Finalmente la mayoría se transfiere al feto. (Hummel y col 1976 a, Hummel y col 1975) Una vez dentro de la célula placentaria, los ácidos grasos se esterifican con el glicerol fosfato, ampliamente disponible debido a la intensa glicólisis. Su almacenamiento transitorio dentro de la placenta será seguido

por una liberación, hidrólisis mediante, a la circulación fetal. Hay una fracción de ácidos grasos que no es esterificada y permanece en forma libre unida a la cara citosólica de la membrana, formando parte de la reserva celular para luego ser también transportados en forma lateral al feto sin gasto de energía. El pasaje de ácidos grasos se encuentra estimulado por la diferencia de concentración a través de la placenta, siendo mayor del lado materno, y por la amplia disponibilidad de albúmina fetal para unir los ácidos grasos transferidos. La placenta tiene un rol crucial en el transporte selectivo de ácidos grasos poliinsaturados, aún contra el gradiente de concentración, importantes para el desarrollo nervioso y reduciendo la necesidad de ingesta de este tipo de ácidos grasos. (Haggarty 2004)

Asimismo, existen otros mecanismos que involucran la captación de triglicéridos, fosfolípidos y ésteres de colesterol maternos. (Herrera 2002) Si bien no hay pasaje directo de triglicéridos a través de la placenta, los ácidos grasos esterificados pueden ser captados y transferidos al feto en desarrollo de la siguiente forma: En un primer paso lipoproteínas ricas en triglicéridos (LDL y VLDL) se unen a receptores específicos. (Thomas 1987) La captación de estas lipoproteínas activa a lipasas intracelulares, las cuales efectúan la desesterificación de los triglicéridos, ésteres de colesterol y fosfolípidos y la liberación de los ácidos grasos. Se han identificado dos lipasas intracelulares en placenta de rata y tres en placenta humana. (Shafrir y col 1987, Kaminsky y col 1991, Aitken y col 1993) Posteriormente los ácidos grasos se re-esterifican transitoriamente y se liberan por lipasas específicas en la cara fetal, aunque también pueden transferirse directamente al feto. Estas enzimas son constitutivas y su actividad no es dependiente de insulina sino de una quinasa dependiente de cAMP. La actividad lipasa aumenta hacia fines de la preñez, sugiriendo un rol de las hormonas de la preñez en su regulación.

En cuanto a los fosfolípidos, son adquiridos de la misma manera que los triglicéridos, mediante desesterificación y esterificación en la placenta, seguidas de su liberación a la circulación fetal. Además, los componentes polares de estos lípidos son sintetizados por la placenta o adquiridos de la circulación materna. De esta manera la placenta aporta los ácidos grasos y grupos polares como la colina para que el feto sintetice sus propios fosfolípidos.

El colesterol y los ésteres de colesterol son transportados en lipoproteínas como LDL y HDL. La captación de estas macromoléculas depende de la presencia de un receptor, e implican la liberación de colesterol en la membrana trofoblástica y su incorporación posterior. La placenta cuenta con receptores específicos similares a los de otros tejidos, sin embargo no se internalizan una vez captado el ligando por lo que se infiere que tienen características especiales. (Alsat y col 1991, Malassine y col 1987, Cummings y col 1982).

En la placenta humana, el colesterol es incorporado, transferido al feto o metabolizado como precursor de la esteroidogénesis placentaria. (Winkel y col 1981) Aparentemente existe una correlación entre la cantidad de hormonas placentarias producidas y los niveles de lipoproteínas plasmáticas, sugiriendo una regulación positiva de la síntesis hormonal por parte de la cantidad de lípidos. (Desoye y col 1987)

En la placenta de rata el colesterol proveniente de circulación será incorporado o transferido al feto en desarrollo. (Pitkin y col 1972, Lin y col 1977) Asimismo, existe síntesis de colesterol a nivel placentario. (Feingold y col 1983) En efecto, sumada a la transferencia lipídica, se ha observado lipogénesis placentaria *de novo*, tanto en humanos como en ratas. (Coleman y col 1987, Diamant y col 1975b, Diamant y col 1978) Se puede decir entonces que la placenta es un órgano activo en cuanto al metabolismo lipídico y a la regulación del transporte de lípidos, fundamentales para el desarrollo y crecimiento fetal.

En la diabetes se han observado anomalías en el metabolismo lipídico placentario, tanto en mujeres diabéticas como en modelos experimentales de diabetes. El incremento en los niveles plasmáticos de ácidos grasos en la madre diabética se relaciona con una mayor transferencia lipídica a nivel de la placenta. En efecto, existe una correlación positiva entre la concentración de lípidos en sangre materna y fetal, (Diamant y col 1980, Hendrickse y col 1985) y entre la acumulación fetal de lípidos y la concentración plasmática materna de los mismos. (Shafrir y col 1982)

Las alteraciones en las vías de transferencia lipídica inducidas por la diabetes son complejas, observándose no solo una mayor transferencia sino también anomalías en la captación de ciertos ácidos grasos. Como ejemplo, puede detallarse que en la placenta de mujer diabética existe una captación incrementada de ácido araquidónico y posterior incorporación preferencial a triglicéridos en lugar de fosfolípidos. (Kuhn y col 1990)

El aumento en los niveles lipídicos en sangre materna resulta en un riesgo para el feto en desarrollo, y constituye uno de los mecanismos involucrados con la aparición de macrosomía fetal inducida por la diabetes materna. (Knopp y col 1986, Szabó y col 1974)

METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO

El NO es un agente vasoactivo producido por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). La reacción enzimática utiliza arginina, oxígeno molecular y NADPH y da lugar a la formación de citrulina, NADP y NO. El NO tiene una vida media corta y es rápidamente metabolizado por oxidación no rápidamente a nitratos y nitritos.

Existen tres isoformas de la NOS: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS). La expresión y actividad de las tres isoformas de la NOS se hallan controladas por diversos factores: La actividad de las dos isoformas constitutivas (nNOS y eNOS) es modulada por Ca^{++} -Calmodulina, no así la actividad de la iNOS, cuya expresión se halla regulada por diversos factores relacionados con la inflamación, infección e hipoxia. (Moncada y col 1991)

Debido a su naturaleza reactiva, el NO puede combinarse con el radical superóxido y otras especies reactivas del oxígeno, dando lugar a la formación de peroxinitritos, radicales altamente nitrosilantes. En concentraciones fisiológicas, estas reacciones se encuentran en un estado de equilibrio fisiológico, sin embargo, cuando hay un aumento de las especies reactivas del oxígeno, se favorece la formación de peroxinitritos. Esta especie es muy reactiva, y entre sus múltiples acciones se destacan la inducción de la peroxidación lipídica, la inactivación de la cadena respiratoria, la rotura de cadenas de ADN, la nitrosilación con consecuente pérdida de la función biológica de varias enzimas y canales y las anomalías en la señalización intracelular porque impide la fosforilación en tirosina. (Szabó y col 2003)

Funciones biológicas

La diversidad de las funciones biológicas del NO tiene su origen en su naturaleza reactiva y sus diversos mecanismos de acción. El NO puede actuar produciendo una inhibición de la cadena respiratoria o de la síntesis de ADN, activando la guanidil ciclasa para producir cGMP, estimulando la ciclooxigenasa para producir prostaglandinas o bien por nitrosilación de proteínas que modifica, entre otros aspectos, la función enzimática.

La función más estudiada del NO es la relajación del tono vascular. El NO producido por la NOS en respuesta a un estímulo, activa la guanidil ciclasa, enzima productora de cGMP, y éste activa a quinasas dependientes de cGMP que fosforilan a) canales y receptores impidiendo la afluencia de Ca^{++}

al citosol, y b) las cadenas livianas de la miosina produciendo la despolimerización, procesos que llevan a la relajación vascular. Estas quinasas son las que también fosforilan a la NOS, translocándola al citoplasma e inactivándola (Hofmann y col 2000, Rybalkin y col 2003). En efecto, la contracción/relajación vascular constituye un claro ejemplo de retroalimentación negativa, ya que el estímulo de contracción produce un aumento de Ca^{++} citosólico y estimula la actividad de la eNOS, que produce NO, el cual induce la relajación vascular vía cGMP y posterior desactivación de la NOS. El cGMP es además un activador de las fosfodiesterasas, enzimas que hidrolizan los nucleótidos cíclicos. (Alexander 1998)

En procesos inflamatorios, se estimula la iNOS, y se produce NO que actúa como antiagregante plaquetario, dilata los vasos, e induce la producción de otros agentes vasoactivos, activando de esta manera al endotelio y contribuyendo al estado de inflamación. (Moncada y col 1991)

Por otro lado, el NO es un inductor de la apoptosis inhibiendo la cadena respiratoria por activación de caspasas, últimos efectores del daño al ADN (Uehara y col 1999) y cumple un rol importante en la modulación de la respuesta inmune, mediando la citotoxicidad de los macrófagos y células “natural killer”. Las células blanco sufren una inhibición de la síntesis de ADN, como así también de la cadena respiratoria, causando finalmente la muerte celular. (Hibbs y col 1987)

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por la adquisición de antigenicidad por parte de ciertos componentes del organismo, y por un reconocimiento anómalo del sistema inmune que reacciona contra los mismos. La citotoxicidad posterior involucra la destrucción del tejido blanco por monocitos, linfocitos, macrófagos y diversas moléculas involucradas en los procesos inflamatorios, diversos mediadores entre los cuales el NO producido por la inducción de la iNOS es un factor de importancia. (Corbett y col 1992)

El NO es un importante modulador de la angiogénesis. Efectivamente, las bajas concentraciones de oxígeno durante la hipoxia estabilizan el dímero de HIF α,β (factor inducible por hipoxia) que se transloca al núcleo e induce factores involucrados en la angiogénesis, entre ellos la iNOS, quien a su vez aumenta la expresión de otros agentes vinculados con procesos angiogénicos. (Wenger y col 1997, Hagen y col 2003) Asimismo el NO estabiliza a HIF α,β induciendo los mismos procesos. (Mateo y col 2003)

En cuanto al sistema nervioso la isoforma constitutiva nNOS cuya actividad es Ca^{++} dependiente se expresa en cerebro, produce NO y éste estimula la producción de cGMP. (Ma 1993) En

el sistema nervioso central actúa como neurotransmisor, en respuesta retrógrada a la estimulación por glutamato, y es aparentemente el mediador de la neurotoxicidad por glutamato en el daño por isquemia cerebral. En cuanto al sistema nervioso periférico interviene en la transmisión del impulso nervioso en el tubo digestivo, en la glándula adrenal y en el cuerpo cavernoso peniano. (Nathan 1992) El NO interviene en los mecanismos de plasticidad neuronal y procesos fisiológicos involucrados en la capacidad de memoria. (Arnaiz y col 2004)

La presencia de citoquinas proinflamatorias (Eizirik y col 2001) y la estimulación con arginina o citrulina provoca la producción de NO por el páncreas endocrino, y éste a su vez incrementa la secreción de insulina. (Nakata y col 2003) Por otra parte, la unión de la insulina a su receptor produce una activación de la NOS unida a la membrana de células de diversos tejidos, y el NO producido tiene efectos hipoglucemiantes. (Kahn y col 2000) En igual sentido, nuestro grupo ha descrito que el NO parece aumentar la captación de glucosa en músculo liso uterino, incrementando el transporte de la misma a través de la membrana celular. (González y col 1995)

El NO está involucrado en la función reproductiva influenciando la sincronización de los ciclos estrales, el comportamiento en el apareo y la regulación de la función ovárica. (Knauf y col 2001, Rettori y col 1993, Jawerbaum y col 1998 a, Jawerbaum y col 1999) Es asimismo un factor determinante en la decidualización y en el proceso de implantación. (Novaro y col 1997, Novaro y col 2001) Durante la preñez su presencia asegura la quiescencia uterina y provoca la vasodilatación necesaria para el establecimiento del flujo sanguíneo que nutrirá al embrión. Su incremento parece estar involucrado en el mecanismo de re-absorción y aborto. (Ogando y col 2003) Por otra parte, así como es un factor que, a través del aumento de cGMP, mantiene al músculo liso relajado durante la gestación, la producción de NO placentario a término, a través de la activación de COX y consiguiente incremento en la producción de prostanoídes, estaría involucrada en el desencadenamiento del trabajo de parto. (Buhimichi y col 1996, Jawerbaum y col 1996a, González y col 1998).

Óxido nítrico y diabetes

Trabajos realizados tanto en nuestro laboratorio como por otros investigadores señalan al incremento de NO como un factor de importancia en la destrucción de los islotes β pancreáticos que dan origen a la diabetes. (González y col 2001 a y b)

El aumento de citoquinas producido durante el ataque autoinmune en la diabetes mellitus es capaz de inducir a la iNOS, que produce NO en cantidades superiores a las isoformas constitutivas y éste provoca daño pancreático. (Corbett y col 1992) En efecto, la expresión de la iNOS está incrementada durante el desarrollo de la enfermedad en modelos experimentales de diabetes. (Kleeman y col 1993) Además de su rol en la destrucción del páncreas en la diabetes insulino dependiente, el metabolismo del NO se ve afectado por la hiperglucemia, y el estrés oxidativo que caracterizan a la enfermedad. (González y col 1999, 2000, 2001 a, 2001 b)

La hiperglucemia provoca la glicosilación inespecífica y no enzimática de los grupos amino de las biomoléculas, produciendo productos de glicosilación avanzada (AGEs). Estas moléculas glicosiladas pierden la función biológica y son causantes de la activación endotelial, provocando la adhesión e infiltración de monocitos activados, la afluencia de citoquinas pro-inflamatorias y senescencia de algunas células endoteliales por glicosilación de los componentes de la membrana basal. (Wautier y col 2004) Por otra parte la hiperglucemia genera por diversos mecanismos un aumento de las especies reactivas del oxígeno que provocan daño tisular, disfunción plaquetaria, desregulación en el transporte de glucosa y anomalías en la remodelación del tejido por activación inespecífica de las metaloproteasas entre otros factores. (Pustovrh y col 2005 b) La generación de aniones superóxido, que secuestran al NO produciendo peroxinitritos, es causante del daño endotelial por nitrosilación. (Bonnefont-Rousselot 2002) Por otra parte el estrés oxidativo provoca la oxidación e inactivación de tetrahidrobiopterina, cofactor de la eNOS. En ausencia del cofactor, la enzima se desacopla, produciendo peroxinitritos en lugar de NO. (Tiefenbacher y col 2003) Efectivamente, en modelos experimentales de diabetes se observó que existe un aumento de la expresión de la eNOS en la vasculatura, mientras que la producción de NO activo es baja con respecto a los animales no diabéticos. (Bitar y col 2005) Por otro lado, la hiperglucemia bloquea la estimulación de NO sobre la enzima guanilato ciclasa, lo cual impide el efecto relajante del NO sobre el músculo liso endotelial. (Weisbrod y col 1993). La falta de biodisponibilidad del NO provoca una disminución en los efectos de relajación y antiagregación plaquetaria que contribuyen al daño endotelial, y por consiguiente a la vasculopatía diabética.

Óxido nítrico en la organogénesis temprana

Es clara e importante la función del NO como morfógeno en diversas especies y en diferentes etapas del desarrollo embrionario. Entre el estadio de cigota y el de blastocisto, el embrión murino experimenta un arresto por el agregado de NO exógeno en forma dosis-dependiente. (Wu y col 2004)

Se ha probado que durante el desarrollo embrionario de algunos peces la expresión de la nNOS muestra un patrón variable correlacionado con la progresiva diferenciación neuronal y con la producción creciente de cGMP dependiente de NO. (Holmqvist y col 2004) En embriones de pollo, el aumento de cGMP sinergiza el efecto de la proteína Sonic Hedgehog, mientras que la diferenciación a neuronas que llevan a cabo las células de la zona media de la placa neural se relaciona con el aumento de la actividad de la guanidil ciclasa mediada por NO. (Robertson y col 2001) En embriones de rata en etapa de organogénesis temprana se observaron anomalías en el desarrollo del mesencéfalo con una evidente muerte apoptótica dosis dependiente en la región del mesencéfalo y el rombencéfalo, debido al agregado de NO exógeno por microinyección intraamniótica. (Lee y col 1996) Existe evidencia de la presencia de la forma inducible de la NOS en embriones de ratón. La inhibición específica de esta enzima o el agregado de NO exógeno provocan defectos en la diferenciación y crecimiento de las neuronas involucradas en el centro olfatorio y la retina. (Arnhold y col 2002) Sin embargo, los embriones dobles recesivos para la iNOS se implantan y desarrollan normalmente hasta mediados de la gestación, aunque luego son reabsorbidos o nacen con anomalías probablemente debido a una disminución en la cantidad de células deciduales y a un anormal engrosamiento de las paredes vasculares placentarias que comprometen la viabilidad fetal. (Burnett y col 2002) Por otro lado se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* que el patrón de expresión diferencial de iNOS y eNOS es fundamental en el desarrollo de las células cardíacas, ya que regula la formación y organización de las miofibrillas. La inhibición de la NOS produce la desorganización de estas miofibrillas, fallas en la tabicación y un aumento de la apoptosis de las células cardíacas, hechos que se correlacionan con disminución en la actividad guanidil ciclasa. (Bloch y col 1999)

Se ha demostrado que el NO es responsable de la correcta formación y crecimiento de las extremidades en el desarrollo embrionario de la rata. (Pierce y col 1995)

En nuestro laboratorio se ha estudiado la producción de NO durante la organogénesis temprana en modelos experimentales de diabetes y diversos mecanismos reguladores del NO sobre agentes involucrados en el desarrollo embrionario. (Jawerbaum y col 2005 a) La producción de prostaglandina E2, metabolito del ácido araquidónico, está modulada positivamente por el NO, (Jawerbaum y col 1998 b) sin embargo esta regulación no es funcional en embriones provenientes de ratas con diabetes severa. (Jawerbaum y col 2001) Asimismo, el NO regula positivamente la producción de endotelina-1, un péptido vasoactivo y modulador a su vez de la producción de otros agentes vasoactivos como los prostanoides. (Sinner y col 2002) Recientemente se ha observado que el NO estaría relacionado con la elevada actividad de metaloproteinasas que se observa en embriones de rata diabética. (Pustovrh y col 2005) Los elevados niveles de NO dan lugar a la formación de peroxinitritos en el embrión durante la organogénesis temprana (Jawerbaum y col 2005 b)

Estos antecedentes demuestran la importancia del NO durante la embriogénesis y la necesidad de una fina regulación de sus niveles. La comprensión de los mecanismos de producción de NO embrionario y las alteraciones inducidas por la diabetes materna en la homeostasis nitridérgica son de especial relevancia para el entendimiento y futura prevención de las anomalías congénitas inducidas por esta patología.

Óxido nítrico y placenta

Como ya se ha mencionado el NO contribuye a la quiescencia muscular uterina produciendo un estado de vasodilatación que incrementa el flujo sanguíneo uteroplacentario, necesario para el desarrollo y crecimiento embrionario. La inhibición de la producción de NO en ratas preñadas provoca un aumento de la presión arterial así como del contenido de proteínas en la orina. Esta inhibición tiene también efectos en la cría, disminuyendo el número de implantes, el número de crías por camada, el peso fetal, neonatal y placentario. (Fernández Celadilla y col 2005) La relajación uterina está aparentemente mediada por los niveles elevados de cGMP, que disminuyen a término y se encuentran bajos en el comienzo del parto. (Telfer y col 2001) Se ha estudiado la contribución de la placenta a ese estado de quiescencia uterina, concluyendo que durante la preñez la placenta podría estar implicada en el mantenimiento de la relajación a través de la liberación de NO. (Syal y col 1999)

El NO está implicado en la angiogénesis, y se ha comprobado que este agente es capaz de regular a las metaloproteasas, enzimas involucradas en procesos de remodelación tisular. La actividad y expresión de metaloproteasas trofoblásticas están moduladas positivamente por NO. (Novaro y col 2001, Pustovrh y col 2000)

Tanto la isoforma eNOS como iNOS han sido detectadas en placenta humana y murina. (Rossmanith y col 1999, Magness y col 1997, Takizawa y col 2002) En la rata, tanto eNOS como iNOS incrementan su expresión a término. En humanos se ha observado que la isoforma eNOS se incrementa a lo largo de la preñez, observándose a principios de la gesta en citotrofoblastos y en el tercer trimestre casi exclusivamente en sinciciotrofoblastos. La enzima también se encuentra en el endotelio vascular placentario. (Rossmanith y col 1999) La expresión de la isoforma iNOS está asociada a los trofoblastos y al endotelio en la placenta humana. (Myatt y col 1993, Lyall y col 1998)

Existe controversia acerca de las alteraciones en la expresión de las distintas isoformas de NOS en la patología diabética humana. Algunos autores señalan que hay un aumento de la expresión de eNOS en placenta de mujeres diabéticas, pre-eclámpticas o en las que se ha detectado retraso del crecimiento intrauterino. (Rossmanith y col 1999) Otros autores señalan que ni la eNOS ni la iNOS, aumentan su expresión en la placenta de mujeres diabéticas. (Lyall y col 1998)

Tanto a nivel sistémico como placentario la administración de inhibidores de la NOS provoca una disminución del flujo sanguíneo y un aumento del tono vascular. (Bisseling y col 2003, Eriksson y col 1984) Se han realizado en los últimos años estudios tendientes a dilucidar el rol del metabolismo nitridérgico en las alteraciones del flujo sanguíneo placentario inducidas por condiciones patológicas como la diabetes y preeclampsia. Una de las hipótesis que se manejan es que la presencia de grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno provoca, por los mecanismos ya mencionados, la formación de peroxinitritos, disminuyendo el NO biodisponible y provocando daño tisular y alteraciones en el flujo sanguíneo utero-placentario. (Myatt y col 2004) En estudios realizados tanto por otros autores como en nuestro grupo de trabajo, se ha observado un aumento de residuos de nitrotirosina (índice del daño provocado por peroxinitritos) en placenta proveniente de pacientes diabéticas y de ratas diabéticas. (Lyall y col 1998, Capobianco y col 2005) Asimismo se ha demostrado que el endotelio placentario de pacientes diabéticas no responde a vasodilatadores y vasoconstrictores como lo hace el proveniente de mujeres sanas, y que el endotelio sano pre-tratado con peroxinitritos muestra una posterior disminución en la respuesta a los agentes vasoactivos. (Kossenjans y col 2000)

Estos descubrimientos asignan al metabolismo nitridérgico, y al estrés nitrosativo un rol central en la regulación del flujo sanguíneo placentario.

LEPTINA

La leptina es producida por el gen *ob*, codificado en la rata en el cromosoma 4(q22) y en humanos en el cromosoma 7(q31.3). La proteína sintetizada es similar en las dos especies, consta de 167 aminoácidos en la forma particulada y 146 aminoácidos en la forma libre luego de la remoción del péptido señal.

Esta hormona fue descubierta y clonada en 1994, (Zhang y col 1994) luego de varios años de experimentación. En 1950 se había identificado una cepa de ratones obesos recesivos para el gen *ob* (*ob/ob*), estos ratones eran hiperfágicos, estériles y presentaban una tasa metabólica disminuida. Paralelamente otra cepa de ratones obesos fue descubierta y llamada *db/db*, esta cepa poseía las mismas características. Más tarde, los experimentos de parabiosis señalaron que los ratones *ob/ob* carecían de un factor soluble que anulaba la hiperfagia y disminuía los depósitos de grasa, y que estas acciones eran mediadas por el hipotálamo. Se identificó a la cepa *db/db* como la portadora de la mutación recesiva para el receptor del gen *ob*. (Coleman y col 1969, Frühbeck y col 2001a)

Experimentos posteriores demostraron que la leptina es el factor soluble del que carecen los ratones *ob/ob* y que esta proteína administrada a los mencionados ratones restaura los parámetros metabólicos, la fertilidad, y la conducta alimenticia normal. Esta hormona es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, para unirse a sus receptores específicos hipotalámicos, y así inhibir la síntesis del neuropéptido Y (NPY). (Erickson y col 1996a) Este neurotransmisor está involucrado en la regulación del apetito y la saciedad, la administración intracerebroventricular del mismo produce hiperfagia, hiperinsulinemia independiente de la hiperfagia y un aumento de la expresión de leptina en el tejido adiposo. (Sainsbury y col 1996) En condiciones de ayuno, se induce la síntesis del NPY y del receptor de leptina en el núcleo arcuato hipotalámico. La estimulación del hipotálamo por el NPY produce una señal que induce la expresión adipocitaria de leptina. El ciclo se cierra cuando la leptina atraviesa la barrera hematoencefálica por medio de un sistema saturable específico (Banks y col 1996) y allí inhibe la producción de NPY. (McAlister y col 2004)

La administración de leptina a los ratones ob/ob disminuye la ingesta, el peso, el porcentaje de grasa, aumenta la tasa metabólica, la actividad física, la temperatura corporal y restaura los valores normales de glucemia e insulinemia, mientras que su administración a ratones normales provoca una pequeña disminución de la ingesta, del peso y del porcentaje de grasa sin afectar los parámetros metabólicos. (Pelleymounter y col 1995) Por otra parte la administración de leptina a ratones normales aumenta el gasto energético y disminuye el cociente respiratorio, sugiriendo una preferencia por la utilización de las reservas lipídicas por sobre las de hidratos de carbono para la respiración celular. (Hwa y col 1996) Si bien se ha observado una correlación entre el contenido de los depósitos lipídicos y los niveles de leptina circulantes, un aumento pequeño en el contenido de reservas lipídicas produce un gran aumento de los niveles circulantes de leptina, mientras que una pequeña disminución en las reservas de grasa, producen un gran decremento en los niveles plasmáticos de la hormona. Estos datos sugieren que la leptina, más que indicar el contenido de las reservas lipídicas del organismo, sería un sensor de las variaciones energéticas.

Otra de las acciones centrales de leptina es la de incrementar la termogénesis: en ratones ob/ob y normales, la leptina induce un aumento en la expresión de las proteínas desacoplantes de la cadena respiratoria de la grasa parda. (Wang y col 1997) Este es un mecanismo crucial para los animales hibernadores, ya que condiciona la regulación de su temperatura corporal.

Como ya se ha mencionado, se cree que la leptina participa en la modulación de la ingesta y el gasto energético, ya que actúa inhibiendo la expresión de NPY. Sin embargo, el bloqueo de NPY en ratones ob/ob no mimetiza totalmente los efectos de leptina. (Erickson y col 1996b) Este hecho señala la existencia de mecanismos NPY-independientes. Estos efectos son periféricos, tanto endocrinos como paracrinos, y se describen a continuación: La administración sub-cutánea de leptina a ratones salvajes provoca una disminución del peso corporal y del contenido de tejido adiposo blanco y pardo, así como disminución del colesterol y triglicéridos plasmáticos. En efecto, el análisis histológico del tejido adiposo de los animales inyectados revela una disminución del contenido celular de gotas lipídicas y un aumento de la cantidad y tamaño de mitocondrias. Además estas células presentan un aumento de la expresión de proteínas desacoplantes UCP-1 y 2, de la lipoproteín lipasa y de la lipasa sensible a hormonas. En conjunto estos datos señalan la capacidad de la leptina para actuar de manera periférica aumentando la lipólisis y la termogénesis. (Sarmiento y col 1997) La lipólisis estimulada por leptina no parece estar mediada por la inhibición o activación de la adenilato ciclasa, sugiriendo un mecanismo

independiente de la regulación de los efectores alfa y beta adrenérgicos. Sin embargo, los depósitos de grasa de distinta localización corporal muestran respuestas diferentes a las mismas concentraciones de leptina, señalando un rol diferencial y tejido-dependiente para la acción de la leptina, y más aún señala la importancia de los efectos paracrinós de esta hormona. (Frühbeck y col 2002) Se ha señalado la posibilidad de la interacción de leptina con NO en la regulación de los efectos lipolíticos. Se ha probado que la administración *in vivo* de leptina incrementa los niveles de NO circulantes, y que la inhibición *in vivo* de la producción de NO produce un bloqueo de la lipólisis estimulada por leptina en tejido adiposo. Además se ha sugerido que el efecto lipolítico de la leptina es mediado por NO. (Frühbeck y col 2001b)

La leptina es promotora de la maduración de pre-adipocitos a adipocitos. Se ha comprobado la presencia de receptores para leptina en pre-adipocitos, cuyo número se incrementa durante la adipogénesis. La leptina promueve la activación de MAP quinasas que actúan durante la proliferación y diferenciación de preadipocitos a adipocitos maduros. (Machinal-Quelin y col 2002)

En músculo esquelético la leptina tiene efectos opuestos a los de la insulina, estimulando las vías de degradación lipídica e inhibiendo los caminos de síntesis de triglicéridos, más aún, promueve la utilización de las reservas lipídicas por sobre las de hidratos de carbono. Se ha demostrado en varios trabajos que la leptina estimula la oxidación basal de ácidos grasos y disminuye la esterificación basal de los mismos, anula los efectos lipogénicos de insulina y tiene una acción inhibitoria sobre la oxidación de glucosa basal y también sobre la estimulada por insulina. (Muoio y col 1999)

El receptor de leptina presenta por lo menos seis variantes diferentes, generadas por modificaciones post-transcripcionales del mRNA generado por el mismo gen. Todas las isoformas presentan una secuencia común de unión al ligando. Hay una variante que carece del dominio transmembrana (Ob-Re), que constituye una especie soluble y secretoria. La misma podría actuar como proteína transportadora, regulando la biodisponibilidad de leptina circulante, estando de este modo involucrada en la regulación de la obesidad. (Sinha y col 1996) Las otras isoformas están ancladas a la membrana plasmática. El receptor de leptina pertenece a la familia de los receptores de citoquina tipo 1, que carecen de actividad fosforilasa intrínseca, y que tiene dominios de reclutamiento de otras quinasas de tirosina de la familia de las Janus (JAKs). La unión de leptina a su receptor dispara modificaciones intracelulares de conformación y origina la dimerización del mismo, con la consiguiente unión de las JAK. Las JAK se fosforilan en residuos de tirosina y fosforilan a su vez al

receptor, lo que provoca la unión de proteínas que se unen a dominios SH2 como las STAT, que luego son también fosforiladas por las JAKs y de esta forma activadas. La activación de estas proteínas provoca su traslocación al núcleo donde se unen al ADN e inducen o inhiben la expresión génica. La activación de las JAKs también puede fosforilar el IRS-1 provocando la activación de MAPKs y generando respuestas cruzadas con vías de señalización de la insulina. (Housecknecht y col 1998, Margetic y col 2002)

Todas las isoformas del receptor de leptina presentan el dominio 1 de unión de las JAKs. La variante larga del receptor, la Ob-Rb, contiene además un dominio 2 y uno 3 de reclutamiento de JAKs y de unión de proteínas STAT, estos dominios son necesarios para la activación de STAT 3, 5 y 6. Esta última vía de señalización ha sido relacionada con los efectos de leptina en el sistema nervioso central, que regulan el apetito y el gasto energético. (Bates y col 2003) Las isoformas cortas se han relacionado con los efectos periféricos de la hormona. Se ha comprobado la existencia del receptor de leptina en tejidos periféricos como hígado, riñón, páncreas, útero, ovario, células sanguíneas, intestino, tejido adiposo blanco y marrón, músculo esquelético y placenta. (Margetic y col 2002)

Leptina y diabetes

Se ha relacionado el estado diabético con anomalías en los niveles de leptina circulante y tisular

En tejido adiposo la insulina induce un incremento en la producción de leptina, por lo que los niveles séricos de insulina se relacionan con los niveles plasmáticos de leptina. En ratas tratadas con estreptozocina los niveles de leptina plasmática están disminuidos, mientras que el tratamiento de estas ratas con insulina produce un incremento en la leptinemia, aún por encima de los niveles basales. Esta relación entre los niveles de insulina y de leptina no parece depender de los niveles de glucemia o la ganancia de peso ya que el aumento en las concentraciones circulantes de leptina luego del tratamiento con insulina es previo a la ganancia de peso. (Sivitz y col 1998) Trabajos realizados en humanos vinculan los niveles de leptina con la diabetes en forma independientemente del peso corporal, de los niveles de glucemia o del porcentaje de grasa corporal, y señalan que existe una clara relación entre la resistencia periférica a insulina y los niveles de leptina, en individuos diabéticos y sanos, tanto delgados como obesos. (Segal y col 1996, Abdegadir y col 2002) Estas evidencias señalan que la

producción adipocitaria de leptina es estimulada por insulina y que ante la ausencia de insulina biodisponible, las concentraciones plasmáticas de leptina disminuyen.

La relación entre los efectos de leptina e insulina son complejas. Si bien existen caminos de señalización en común entre la insulina y la leptina, esta última tiene un claro efecto inhibitorio sobre algunas vías de señalización de la insulina. (Kellerer y col 2001) En tejido adiposo la leptina muestra una acción opuesta a la de la insulina ya que inhibe el transporte de glucosa estimulado por insulina y la lipogénesis, y promueve la oxidación lipídica y la movilización de ácidos grasos. En el músculo la leptina favorece la oxidación de lípidos y disminuye su síntesis, sin embargo aumenta el transporte de glucosa y estimula la síntesis de glucógeno muscular, y presentando, por lo tanto, un efecto hipoglucemiante por estimulación de la incorporación de glucosa al tejido muscular. (Ceddia y col 1998)

Fisiológicamente la insulina se secreta en respuesta a glucosa y a distintos estímulos nerviosos y hormonales. La leptina inhibe la síntesis y secreción de insulina basal y estimulada tanto en células β aisladas como en diversas líneas celulares, islotes pancreáticos y perfusatos de páncreas. (Ishida y col 1997, Mizuno y col 1998) Este efecto estaría mediado tanto por una disminución de la transcripción del gen de la insulina como por una menor liberación de insulina tanto en ausencia de estímulo como ante el estímulo de glucosa, GLP-1, y otros agentes dependientes de la vía de fosfolipasa C. (Seufert y col 1999, Fehmann y col 1997, Chen y col 1997) Dicho bloqueo parece llevarse a cabo a través de una interferencia con los mecanismos de liberación de Ca^{++} intracelular y de apertura de los canales de potasio. (Kieffer y col 1997) Dado que la leptina tiene efectos inhibitorios no solo sobre la acción insulínica, sino también sobre la síntesis de la misma, se postula que actúa como señal de retroalimentación negativa que acota los efectos anabólicos de insulina, inhibiendo su síntesis y contribuyendo con el balance fisiológico necesario para el funcionamiento del organismo.

En condiciones patológicas en las que hay una incorporación excesiva de grasas en tejidos extra adiposo, los ácidos grasos de cadena larga se acumulan en el interior de las células, donde promueven la apoptosis mediada por lípidos. Diversos autores han demostrado que en tejidos tales como el páncreas endocrino la leptina previene esta acumulación y logra preservarse la función del órgano. (Shimabukuro y col 1997, Wang y col 1998)

Todos estos datos en conjunto sugieren que la leptina, además de su acción sobre el sistema nervioso central tiene un efecto periférico opuesto al de la insulina, que conduce a redireccionar la

obtención de energía del organismo hacia el consumo de lípidos, induciendo la movilización grasa desde los reservorios adipocitarios para su utilización en el músculo. Las alteraciones en la producción o mecanismos de acción de leptina conducen a la acumulación lipídica en diferentes tejidos, entre ellos el páncreas, lo que determina el mal funcionamiento del órgano, con el consecuente desarrollo de la diabetes. Por otro lado, la deficiente producción de insulina altera la síntesis de leptina, lo que redundaría en un agravamiento de la dislipemia.

Leptina y preñez

Ya se han detallado las importantes modificaciones metabólicas inducidas por la preñez y necesarias para el correcto desarrollo embrionario. Estos cambios están dirigidos por hormonas producidas durante la gesta, especialmente la prolactina y las hormonas esteroideas. Se considera que la leptina jugaría un importante rol durante la preñez. A lo largo de la gestación los niveles plasmáticos de la hormona se incrementan. (Sagawa y col 2002) A medida que la gestación avanza, la masa lipídica corporal materna aumenta, así como el consumo de O₂ y la oxidación lipídica por sobre la de glucosa, característicos del estado de insulino resistencia inducido por las hormonas de la preñez. La mayor concentración plasmática de leptina se correlaciona con un aumento de la oxidación lipídica, sugiriendo que el incremento en los niveles de leptina podrían estar implicados en las modificaciones del metabolismo lipídico inducidas por la gesta. (Okereke y col 2004)

Un aspecto controversial acerca del aumento de leptina en gestantes es que disminuye su efecto sobre la ingesta, ejercido a nivel central, acción característica fuera de la gestación. Durante la misma existe un estado de resistencia hipotalámica a la leptina, (Ladyman y col 2004) mediado por las hormonas de la preñez lo que permite el aumento de la ingesta materna necesaria para el desarrollo fetal.

En forma interesante, la placenta produce leptina, contribuyendo a la hiperleptinemia inducida por la preñez. En ratones se ha comprobado la producción placentaria de leptina y de altos niveles de la isoforma soluble del receptor, que se une a la leptina plasmática, aumentando su vida media. (Hoggard y col 1997, Gavrilova y col 1997)

Las ratas muestran un aumento progresivo de la leptinemia, así como de la producción placentaria de leptina a medida que avanza la preñez, observándose picos de máxima producción en el día 21 de gestación. (Amico y col 1998)

En humanos y primates el aumento de leptina en sangre durante la preñez, ha sido en parte adjudicado a la producción placentaria, aunque también se considera el aporte de la masa adiposa que a su vez se halla incrementada. (Castracane y col 2005) Sin embargo, el mayor aumento de leptina ocurre en el primer trimestre de embarazo, cuando aún no se han manifestado grandes variaciones lipídicas corporales maternas. Por otra parte, se observó una disminución dramática en los niveles de leptina luego del parto o cesárea, simultáneamente con una mayor concentración de leptina en vena que en arteria umbilical, sugiriendo que la placenta es la mayor fuente de leptina plasmática. (Henson y col 2000)

En un intento por dilucidar el rol de la leptina durante la gesta muchos trabajos han establecido correlaciones entre diversos parámetros de crecimiento fetal y placentario y las concentraciones de leptina halladas en los distintos fluidos. Los niveles plasmáticos de leptina guardan relación con los de cordón umbilical y éstos a su vez se correlacionan con el peso del neonato y de la placenta. Por otra parte, el peso del neonato está vinculado con el peso placentario. (Manderson y col 2002, Jakimiuk y col 2003, Papageorgiou y col 2004) Estos resultados sugieren que la leptina estaría directamente relacionada con el crecimiento fetal. (Ong y col 1999) Algunos autores han observado un efecto estimulador de la leptina sobre la secreción de la GHRH hipotalámica fetal en ratas preñadas, e hipotetizan que éste podría ser uno de los mecanismos de acción de leptina que justifica las correlaciones mencionadas. (Tannenbaum y col 1998) En feto de ratón se ha demostrado la presencia del receptor de leptina en múltiples tejidos tales como cerebro, cartílago, hueso, pulmón, folículos pilosos y bulbos dentales, entre otros, sugiriendo efectos pleiotrópicos de esta hormona. (Hoggard y col 1997) Se ha determinado la presencia de leptina en la vasculatura postulándose que participa en los procesos angiogénicos. Cumpliría un papel importante en la formación de nuevos vasos feto-placentarios y en la hemopoyesis fetal. (Henson y col 2000) También se ha demostrado que existe síntesis de leptina en el tejido adiposo subcutáneo fetal en formación. (Atanassova y col 2000)

La leptina está relacionada con la producción hormonal placentaria; su síntesis y liberación está asimismo modulada por hormonas. En el laberinto murino la leptina co-localiza con las hormonas lactógeno placentario I y II. (Kawai y col 1999) En trofoblastos humanos, la diferenciación de

citotrofoblasto a sinciotrofoblasto es concomitante con un aumento en la producción de leptina y la presencia de retinoides incrementa aún más su producción. (Guibourdenche y col 2000) Los compuestos como ésteres de forbol y activadores de la proteína quinasa A y C estimulan la síntesis de leptina por trofoblastos en cultivo. (Yura y col 1998) En este mismo sistema se ha observado que citoquinas pro-inflamatorias como la interleucina 1 y 6 estimulan la producción de leptina, al igual que estradiol y GnRH. (Chardonens y col 1999, Islami y col 2003) Como ya se había demostrado para otros tejidos, la insulina estimula la producción de leptina placentaria. (Coya y col 2001)

El pasaje de leptina hacia el feto a través de la placenta aumenta con la gesta, de la misma manera que aumenta la leptina plasmática y la presencia de la isoforma soluble del receptor en el laberinto murino. (Smith y col 2003, Amico y col 1998, Gavrilova y col 1997, Henson y col 2000, Sagawa y col 2002)

Altas concentraciones de glucocorticoides disminuyen la ganancia de peso materno, placentario y fetal, así como la concentración de leptina fetal y la producción de leptina placentaria, (Sugden y col 2001) aumentando los niveles de la isoforma soluble del receptor en la placenta pero disminuyendo el pasaje de leptina hacia el feto, manteniendo de esta forma la leptina del lado materno e induciendo retraso de crecimiento fetal. (Smith y col 2003)

La presencia del receptor de leptina en la placenta sugiere un rol autocrino y paracrino de esta hormona. La expresión de este receptor es regulada por hormonas que median sus efectos a través del cAMP. (Señaris y col 1997, Yamaguchi y col 1998) La expresión y la fosforilación del receptor en la isoforma larga y corta se ha comprobado en las microvellosidades de la membrana apical del sinciotrofoblasto, mientras que la isoforma soluble ha sido localizada en la membrana basal del mismo. (Ebenbichler y col 2002)

La leptina estimula la liberación de hCG, índice de funcionalidad placentaria, e inhibe la secreción de progesterona en cultivos de trofoblastos de manera dosis-dependiente (Cameo y col 2003). Además de la regulación de la producción hormonal, la leptina modula la secreción de componentes de matriz extracelular como la fibronectina y las metaloproteasas 2 y 9, así como la actividad gelatinolítica de las mismas. (Castelluci y col 2000)

En condiciones patológicas la producción y los niveles plasmáticos de leptina están alterados. En los casos de abortos espontáneos se han reportado bajas concentraciones de leptina sérica. (Henson y col 2000) Existen datos controversiales acerca de la producción de leptina y sus niveles circulantes en

pacientes diabéticas. Algunos autores han observado niveles elevados de leptina en plasma de pacientes con diabetes severa, con su metabolismo controlado y con administración de insulina, (Lea y col 2000) mientras que otros no han observado diferencias entre los niveles circulantes de leptina en mujeres sanas y diabéticas. (Leperq y col 1998) En pacientes con diabetes gestacional con control únicamente dietario, se han observado niveles disminuidos de leptina circulante, (Festa y col 1999) al igual que en aquellas gestaciones complicadas con retraso de crecimiento fetal. (Leperq y col 1998) En la diabetes los niveles de leptina plasmática se correlacionan con la concentración de leptina en cordón umbilical y con el peso del neonato, (Manderson y col 2002) lo que señala que existe una relación entre los niveles de leptina y el grado de control metabólico de la paciente.

No se han observado diferencias en la presencia del receptor de leptina en placenta de mujeres sanas y pacientes diabéticas, sin embargo se ha observado un aumento en la expresión de leptina placentaria en pacientes con diabetes tratadas con insulina y una disminución en las gestaciones con retraso de crecimiento intrauterino. (Lea y col 2000, Leperq y col 1998)

La leptina parece cumplir un importante papel regulatorio en la preñez, posiblemente perturbado en la gesta diabética. Sin embargo, no se han dilucidado aún los mecanismos que alteran su producción en la diabetes o cuáles serían sus consecuencias.

El presente trabajo de tesis se basa en los antecedentes mencionados, que sugieren que la leptina a nivel parácrino y /o autócrino estaría involucrada en el crecimiento fetal y en el metabolismo lipídico de la unidad fetoplacentaria, y que dichas funciones podrían estar alteradas como resultado de anomalías en los niveles y/o función de leptina inducidas por la diabetes materna.

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis general

La patología diabética induce anomalías metabólicas y de desarrollo embrionario y placentario durante la gestación mediante mecanismos que involucran a la leptina.

Objetivo general

Estudiar las anomalías inducidas por la diabetes en el desarrollo embrionario y en el metabolismo lipídico y del óxido nítrico embrionario y placentario, y determinar la participación de leptina en dichas alteraciones.

Hipótesis de trabajo:

- ✘ La leptina está involucrada en las anomalías en el desarrollo embrionario inducidas por la patología diabética durante el período de organogénesis temprana.**
- ✘ La leptina regula los niveles de óxido nítrico y el metabolismo lipídico embrionario, modulando de esta manera el desarrollo de los embriones**
- ✘ La diabetes provoca alteraciones en los niveles embrionarios de leptina, anomalías que condicionan el metabolismo nitridérgico y lipídico en esta patología.**
- ✘ La leptina modula la función de la placenta a través de la regulación de su metabolismo lipídico y nitridérgico.**

- ✘ **La diabetes provoca alteraciones en la producción de leptina placentaria, anomalías que condicionan el metabolismo lipídico y nitridérgico en este tejido.**

Objetivos específicos:

- ✘ **Caracterizar, durante el período de organogénesis temprana, el desarrollo y crecimiento de embriones provenientes de ratas sanas y diabéticas. Evaluar el efecto de leptina sobre el desarrollo embrionario en un entorno normal y diabético.**
- ✘ **Evaluar la influencia de la diabetes materna sobre la producción de leptina y de óxido nítrico en el embrión durante la organogénesis temprana. Investigar una posible modulación de la producción de óxido nítrico embrionario por leptina.**
- ✘ **Estudiar el efecto de la diabetes materna en el metabolismo lipídico embrionario. Investigar un posible rol regulatorio de leptina sobre el metabolismo lipídico en embriones de ratas sanas y diabéticas.**
- ✘ **Caracterizar el efecto de la diabetes sobre la producción de leptina y óxido nítrico en placenta a término de ratas sanas y diabéticas. Evaluar una posible modulación de la producción de óxido nítrico placentario por leptina.**
- ✘ **Estudiar la influencia de la diabetes materna en el metabolismo lipídico placentario. Investigar la existencia de una posible función regulatoria de leptina sobre el metabolismo lipídico en placenta a término de ratas sanas y diabéticas.**
- ✘ **Caracterizar el efecto de la diabetes gestacional y pre-gestacional humana sobre los niveles de leptina y óxido nítrico en placenta a término. Evaluar una posible modulación de los niveles de óxido nítrico por leptina en la placenta humana.**
- ✘ **Evaluar un posible rol regulatorio de leptina sobre el metabolismo lipídico en placenta humana a término y en cultivo primario de trofoblastos.**

Materiales y métodos

ANIMALES

Se utilizaron ratas de la cepa Albino-Wistar, alimentadas con alimento balanceado y agua suministrados en forma libre. Los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12 y 12 horas respectivamente, con temperatura controlada a 20°C.

En el período neonatal, las hembras fueron inyectadas s.c. con las dosis de estreptozotocina (grupo de ratas diabéticas) o solución de buffer citrato (grupo de ratas control) según se detalla posteriormente.

Los animales adultos fueron apareados con machos sanos, se constató la presencia de espermatozoides en el extendido vaginal de las hembras, y éste fue designado como día 0.5 de preñez.

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical en el día 10.5 o 20.5 de gesta.

PACIENTES

Mediante un convenio realizado con el Hospital General de Agudos Carlos Gustavo Durand, Departamento de Ginecología y Obstetricia, a cargo del Dr. Mario Pesaresi y a través del Servicio de Diabetes a cargo del Dr. Mario Baier, se obtuvo el tejido placentario de mujeres sanas y diabéticas luego del alumbramiento o cesárea, con consentimiento de la paciente. El tejido placentario fue inmediatamente trasladado al CEFYBO, donde se realizaron los procedimientos que se describen a continuación.

MATERIALES

Sales: CNa, NaHCO₃, MgSO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, ClK, MgCl₂, CaCl₂

Glucosa (SIGMA o Mallinkrodt)

Solventes: metanol, etanol, cloroformo, éter etílico, hexano, ácido acético, ácido trifluoroacético, formaldehído, xilol (Merck, Mallinkrodt o Baker)

Solvente de desarrollo cromatográfico: Hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:2)

Líquido de Centelleo: 35 mg de 1,4-Bis (5-phenyl-2-oxazolyl) benceno (POPOP) (Sigma), 280 mg de 2,5- Diphenyloxazole (PPO) (Sigma) en una solución de Tolueno: Tritón (70:30), (Sigma).

Soluciones y medios de cultivo

Medio Krebs-Ringer Bicarbonato salino con capacidad buffer (KRB): Glucosa 11mM, Na⁺ 145 mM, Cl⁻ 127 mM, HCO₃⁻ 25mM, Mg²⁺, SO₄²⁻ y PO₄²⁻ 1.2 mM.

Medio fosfato salino (PBS): K₂HPO₄ 1.5 g/L, KH₂PO₄ 0.2g/L, NaCl 7.75 g/L.

Medio Tyrodes salino con capacidad buffer e indicador de pH: NaCl 8 g/L, glucosa 1g/L, NaHCO₃ 1 g/L, ClK 0.2 g/L, MgCl₂ 0.1 g/L, NaH₂PO₄ 0.056 g/L, CaCl₂ 0.051 g/L, Penicilina 64 µg/L, Estreptomicina 100 µg/L, rojo fenol 10 mg/L. Disuelto en H₂O estéril y libre de sustancias embriotóxicas.

H₂O de cultivo libre de sustancias embriotóxicas (SIGMA)

Medio HANK'S salino con capacidad buffer e indicador de pH (SIGMA)

Medio D-MEM de cultivo mínimo esencial modificado por Dulbecco (SIGMA)

Medio D-MEM + F12 de cultivo mínimo esencial modificado por Dulbecco con un suplemento que sustituye la adición de suero fetal bovino (SIGMA)

Suero Fetal Bovino (GIBCO)

Percoll (GIBCO)

Buffer citrato (SIGMA)

Buffer para determinación de glicerol: Solución de hidrato de hidracina (FLUKA)

Soluciones de fijación de tejido placentario: formol al 4% en PBS.

Solución Bouin: Formol 10%, ácido acético glacial 5%, en una solución saturada de ácido pícrico en H₂O

Reactivo de Bradford (BIORAD)

Peróxido de hidrógeno (Mallinkrodt)

Hematoxilina de Mayer (álwik)

Drogas

Estreptozotocina (SIGMA)

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

Espermin-NONOato: (SP-1) (Cayman)

Nitroprusiato de sodio (NP) (SIGMA)

Valina, Citrulina (SIGMA)

Glicina (BIORAD)

Tetra acetato de etieldiamina. (EDTA) (SIGMA)

Diaminobencidina (DAB) (SIGMA)

DL- Ditiotreitól (DTT) (Sigma)

Nicotinamida-adenenín dinucleótido NAD (SIGMA)

Nicotinamida-adenenín dinucleótido fosfato reducido NADPH (SIGMA)

Adenosina 5' trifosfato ATP (SIGMA)

Fosfolípidos (mezcla de fosfatidilserina y fosfatidilcolina), colesterol, triglicéridos, ésteres de colesterol para curvas estándar de lípidos (Doosan)

Enzimas:

Desoxirribonucleasa 1 y Tripsina (SIGMA) (Cedidas gentilmente por la Dra. Lorenza Diaz)

Gliceroquinasa, y Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Roche).

Antibióticos:

Estreptomícina, penicilina y anfotericina B (SIGMA)

Mezcla de estreptomícina-penicilina para cultivo (GIBCO)

Substancias Radioactivas:

[¹⁴C] L-Arginina, (Dupont) [¹⁴C] Acetato de sodio. (Amersham)

Equipos comerciales de determinación colorimétrica

Nitratos y nitritos (Cayman)

Leptina humana (Assay Designs)

Leptina de rata (Assay Designs)

Insulina (MercoDía)

Anticuerpos:

Anticuerpos primarios: anti-leptina de rata hecho en conejo (Santa Cruz), anti-receptor de leptina de rata hecho en cabra (Santa Cruz), anti-iNOS y anti-eNOS hechos en ratón (Santa Cruz)

Anticuerpos secundarios: anti IgG de ratón hecho en cabra, anti IgG de conejo hecho en ratón y anti IgG de cabra hecho en burro. (SIGMA)

Anticuerpos terciarios: IgG de conejo, de cabra y de ratón acoplados al sistema PAP (peroxidasa-antiperoxidasa) (SIGMA).

Otros

Resina de intercambio catiónico en su forma sódica: DOWEX AG-50W-X8
(BIORAD)

Glutamina: Suspensión de GIBCO

Parafina: Paraplast de Oxford Laboratories

Placas de cromatografía en capa delgada de sílica-gel preparadas sobre vidrio (MERCK)

Tiras reactivas y sensor Accu-Check (ROCHE)

Columnas de extracción y purificación en fase reversa sólida con octodecilsilano (C-18) como soporte (J.T. Baker)

VectaBond: reactivo de tratamiento de portaobjetos para inmunohistoquímica. (Vector Laboratories)

Pegamento fijador de cubre-objetos: Entellan (Sigma)

MÉTODOS

Inducción del Modelo de Diabetes Experimental

Se administró estreptozotocina disuelta en buffer citrato (100 mg/Kg) o el vehículo a ratas hembras en período neonatal (día 2 de nacimiento) en forma sub-cutánea según la técnica descrita por Portha y col. (Portha y col. 1979) Debido a la presencia de 2-deoxiglucosa en su estructura, la estreptozotocina tiene especificidad de unión a las células β pancreáticas; el páncreas endocrino de los animales recién nacidos se destruye pero sufre luego un proceso de regeneración parcial, debido al período neonatal en que se aplica la droga. Las ratas así tratadas muestran una función pancreática limitada en su edad adulta, con hiperglucemias moderadas y una curva de tolerancia a la glucosa anómala. La diabetes se confirmó mediante la evaluación de la glucemia a los dos meses y medio de la administración de la droga.

Evaluación de la glucemia: Se obtuvo sangre de la vena central de la cola y se determinó el valor de glucemia mediante un método colorimétrico comercial empleando tiras reactivas y lector de glucemia Accu-Check de Roche. Se consideraron diabéticas aquellas ratas que presentaron valores de glucemia superiores a 180 mg/dL. El 80 % de las ratas tratadas desarrollaron diabetes.

Los valores de glucemia de las ratas inyectadas con buffer citrato fueron inferiores a 100 mg/dL.

Obtención de Suero de Rata

Se anestesiaron los animales con vapores de éter, se les practicó una incisión abdominal y se obtuvo sangre de la arteria abdominal con una jeringa sin anticoagulantes. Debido a que los sueros fueron utilizados luego para el cultivo embrionario, la sangre se centrifugó dos veces inmediatamente después de la extracción para eliminar sustancias embriotóxicas. El suero se conservó a -70°C hasta el momento de su uso, por no más de 6 meses.

Determinaciones en Suero

Leptinemia

Se utilizó un equipo comercial cuya técnica de determinación se basa en el “doble sándwich directo”. En el ensayo utilizado, un anticuerpo policlonal contra leptina está fijo en la base de una microplaca. La leptina proveniente de las muestras o de la curva es inmovilizada por interacción con este anticuerpo durante 1 hora a 37°C . Se aspira y lava el material no inmovilizado y luego se adiciona un segundo anticuerpo policlonal contra la hormona, que está acoplado a la enzima peroxidasa. Luego de 30 minutos se lava el exceso de anticuerpo. A continuación el sustrato 3,3',5,5' tetrametilbencidina se adiciona conjuntamente con peróxido de hidrógeno. En este momento se produce una oxidación enzimática del sustrato y se obtiene como producto un compuesto cromogénico cuya absorbancia se lee a 450 nm. La concentración de leptina es directamente proporcional a la lectura de densidad óptica. Las absorbancias de las muestras se refieren a una curva de cantidades conocidas de leptina, y los niveles de leptina se expresan como ng de leptina por mL de suero.

El coeficiente de variación entre ensayos es menor al 8% y el coeficiente de variación intra-ensayos está por debajo del 13%. La sensibilidad del ensayo es de 25.5 pg de leptina /mL.

Insulinemia

Se determinó la insulinemia basal y post carga, evaluada luego de 15 minutos de la administración intraperitoneal de glucosa 1.5 mg/kg, en ratas sanas y diabéticas por administración neonatal de estreptozotocina.

Se utilizó un equipo comercial cuya técnica se basa en el “doble sándwich directo”. El primer anticuerpo monoclonal contra insulina está fijo en la base de una microplaca. La insulina proveniente de las muestras o de la curva estándar es inmovilizada por interacción con el anticuerpo durante 1 hora a 37°C. Se aspira y lava el material no inmovilizado y luego se adiciona un segundo anticuerpo monoclonal contra otro epítipo de la insulina que está acoplado a la enzima peroxidasa. Luego de 30 minutos se lava el exceso de anticuerpo. A continuación el sustrato 3,3',5,5' tetrametilbencidina se adiciona conjuntamente con peróxido de hidrógeno, agregados que producen una oxidación enzimática del sustrato y un producto cromogénico cuya absorbancia se lee a 450 nm. La concentración de insulina es directamente proporcional a la lectura de densidad óptica. Las absorbancias de las muestras se refieren a una curva de cantidades conocidas de insulina y los niveles de la hormona se expresan como nmoles de insulina por mL de suero.

El coeficiente de variación entre ensayos es menor al 3% y el coeficiente de variación intra-ensayos está por debajo del 4%. El límite de detección del ensayo es de 0.07 µg/mL

Determinaciones Embrionarias

Cultivo de embriones en etapa de organogénesis temprana

La técnica utilizada, descrita por New (New 1978), permite el desarrollo in vitro de embriones de roedor desde la etapa presomítica hasta el cierre de tubo neural. Siendo este el período de mayor susceptibilidad a las malformaciones congénitas, se destaca su utilidad para analizar el efecto de agentes teratógenos o entornos patológicos sobre el desarrollo y crecimiento embrionario.

Preparación del medio de cultivo

Se obtuvieron los sueros de animales sanos y diabéticos en la forma antes descrita, y se inactivó el complemento durante una hora a 56°C. Posteriormente se diluyeron 3:1 en medio tyrodes preparado en esterilidad y se gasearon los tubos conteniendo 3 ml de la solución final con una mezcla baja en oxígeno: O₂:CO₂:N₂ 5:5:90. El gaseo se repitió en presencia de los embriones. Se cultivaron tres embriones por tubo en presencia de suero de rata control o diabética con o sin el agregado de leptina en las concentraciones indicadas.

Obtención de los embriones

Se sacrificaron hembras sanas en el día 9.5 de preñez, se practicó la histerectomía, se abrió el útero y se obtuvieron los conceptos. Bajo lupa, los embriones fueron liberados de la decidua materna mediante pinzas y fórceps adecuados, dejándolos rodeados de sus membranas (saco vitelino, saco amniótico y cono ectoplacentario). Se rasgó la membrana de Reichert para permitir el intercambio entre el embrión y el medio de cultivo.

Una vez gaseados por segunda vez, los tubos se mantuvieron girando en un rotor a 35 r.p.m. dentro de una estufa con humedad controlada a 37°C por 16 hs. luego de las cuales se gasearon los cultivos nuevamente, esta vez con una proporción distinta de gases: (O₂:CO₂:N₂ 15:5:80). A las 24 hs. se finalizó el cultivo y los embriones fueron liberados de sus membranas y lavados con PBS. Se procedió a evaluar los parámetros morfológicos embrionarios.

Evaluaciones morfológicas

La evaluación morfológica consistió en la observación del estado de rotación axial del embrión, cuantificación del número de somitas, el grado de cierre o aposición del tubo neural, tamaño y latido cardíaco y presencia de otras anomalías morfológicas, de acuerdo a criterios desarrollados por Brown y Fabro. (Kaufman 1990) Luego se procedió a la medición de proteínas embrionarias, índice de crecimiento fetal.

Obtención de embriones de 10.5 días de preñez:

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical, se les practicó la histerectomía y seguidamente se colocó el útero con los embriones en una caja de Petri con solución KRB. Se realizó una incisión dorsal en el útero y se extrajeron los conceptos. Posteriormente y bajo lupa, se liberó a los embriones de la decidua y membranas embrionarias (saco vitelino, corion, amnios y alantoides) con la ayuda de pinzas, tijeras y fórceps. Una vez obtenidos los embriones, se procedió a la evaluación morfológica y/o a realizar las preparaciones histológicas, los dosajes y las incubaciones que se describen a continuación.

Medición de proteínas

La medición de proteínas se realizó mediante la técnica descrita por Bradford (Bradford y col 1976). Se tomó una alícuota de 10 µl del producto del sonicado de los embriones y se suspendió en el reactivo de Bradford diluido 1:5 en solución salina. Paralelamente se preparó una curva estándar con cantidades conocidas de albúmina en el mismo reactivo de trabajo. Luego de 5 minutos se cuantificó la aparición de un compuesto cromogénico por lecturas espectrofotométricas de la densidad óptica de las muestras, refiriéndolas a las correspondientes a una curva de concentraciones conocidas. Los valores se expresaron como µg de proteína.

Inmunolocalización de leptina

Los embriones de ratas sanas y diabéticas explantados en día 10.5 de gestación se fijaron en solución de Bouin durante 6 horas, luego de lo cual se reservaron en etanol: agua (70:30) a 0° C hasta el momento de su inclusión en parafina.

Inclusión en parafina

Los embriones fijados fueron deshidratados sometidos a los siguientes solventes: etanol 90%, etanol 95%, por 5 minutos cada uno y luego etanol 100%, etanol: benceno (1:1) y benceno durante 3 minutos cada uno. Posteriormente se los sumergió en parafina líquida a 56° C en estufa con temperatura

controlada durante 2 horas. Luego de este período se los dispuso en cubos de parafina líquida con una orientación céfalo-caudal determinada, y se los dejó solidificar a temperatura ambiente.

Se realizaron cortes seriados transversales de 5 micrones de grosor por medio de un micrótomo. Los cortes fueron situados en portaobjetos previamente tratados con Vectabond para evitar que los mismos se despeguen. En un mismo portaobjetos se situaron muestras de embriones de ratas diabéticas y embriones de ratas sanas.

Marcación con anticuerpos

Los cortes fueron desparafinados en xilol durante 5 minutos, y luego fueron rehidratados por exposición a una sucesión de solventes (xilol: etanol 1:1; etanol 100 %, etanol 96%, etanol 70%) Finalmente se completó la hidratación con PBS durante 2 minutos. Debido a que el sistema de revelado depende de la actividad peroxidasa, se bloquearon las peroxidasas endógenas con una solución 3 % de peróxido de hidrógeno durante 5 minutos. Asimismo, se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución al 1% de suero de cabra en PBS-tritón (0.2 %). Posteriormente se agregó el primer anticuerpo policlonal contra leptina hecho en conejo diluído 1:10 en PBS. Se incubó en cámara húmeda a 4°C durante 48 horas. Luego de ese período se lavó el anticuerpo primario excedente y se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario, una solución 1:50 en PBS de anticuerpo anti-inmunoglobulina de conejo desarrollado en cabra. Luego de los lavados se agregó el complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP-conejo), diluido 1:100 en PBS, y se incubó durante 1 hora. Con este procedimiento se amplificó la señal del segundo anticuerpo. A continuación se realizaron lavados y se reveló la presencia de leptina mediante la adición del sustrato de la peroxidasa, DAB 6% (p/ v) en TRIS 0.06 M pH: 7.4 y peróxido de hidrógeno 0.01%. La enzima peroxidasa cataliza la oxidación de DAB produciendo un color marrón claramente distinguible en los cortes. La reacción fue seguida bajo microscopio. Se dejó interactuar durante 30 minutos, se detuvo la reacción con agua y se lavó el exceso de sustrato y producto cromogénico con PBS. Por último se realizó una contratinción de núcleos con hematoxilina durante 30 segundos.

Se realizó el control negativo procesando de igual forma a los tejidos, pero sin adición del anticuerpo primario.

Posteriormente se deshidrataron los cortes por exposición a sucesivos solventes (etanol 70 %, etanol 96%, etanol 100%, etanol:xilol 1:1, durante 3 minutos cada uno y xilol 100% durante 5 minutos), colocando luego cubreobjetos adheridos con fijador Entellan sobre los mismos.

Los cortes así tratados se estudiaron bajo microscopio Zeiss y se evaluó la intensidad de la marca mediante un programa analizador de imágenes (Image –Pro Express 4.5).

Determinación de los niveles de leptina embrionaria

Se utilizó un equipo comercial de dosaje de leptina de rata (Assay Design), según las instrucciones indicadas. Se homogeneizaron embriones de día 10.5 de gestación (siete embriones por muestra) y de día 13.5 de gestación (explantados en forma semejante a la descrita para el día 10.5 de gestación, tres embriones por muestra) en 1 ml de ácido acético 6%. Una vez reservada una alícuota para la cuantificación de proteínas, el homogenato fue centrifugado y el sobrenadante sembrado en columnas de purificación en fase reversa, activadas con metanol y agua acidificada (pH:5). Se lavó el material inespecífico contenido en las columnas con una solución de ácido trifluoroacético al 0.1 % . Posteriormente se eluyó el material retenido por medio de una mezcla de metanol: agua: trifluoroacético (90:10:0.1). Se evaporó el eluato en un equipo concentrador y luego se reconstituyó en el solvente de ensayo provisto por el equipo comercial. Tal como se describió anteriormente en detalle (determinación de la leptinemia) se dejó interactuar la muestra con el anticuerpo primario fijo en la base de la microplaca, y posteriormente se adicionó el segundo anticuerpo acoplado a la peroxidasa. Luego de los lavados correspondientes se adicionó el sustrato 3,3',5,5' tetrametilbencidina y se leyó la densidad óptica del complejo cromogénico a 450 nm, refiriendo las lecturas de las muestras a las absorbancias de una curva de concentraciones conocidas. Los resultados se expresaron como pg de leptina por mg de proteína embrionaria.

Dosaje de los niveles de nitratos y nitritos embrionarios

Cada muestra se preparó incubando 4 embriones en 1 ml de medio KRB, en presencia o ausencia de leptina en concentraciones 1 y 30 nM. La incubación fue realizada en un baño metabólico con agitación a 37°C, con gaseado permanente de CO₂ y O₂ en proporciones 5: 95. Luego de 3 horas de incubación se guardaron los embriones a –70°C. En forma previa al dosaje de nitratos/nitritos, índice de producción de NO, se sonicaron las muestras embrionarias en 200 µL de buffer TRIS 100 mM pH: 7.4, y luego de separar una alícuota para medir proteínas, se centrifugó. Se tomaron 80 µL del sobrenadante para realizar

el ensayo como se describe en las instrucciones del equipo comercial (Cayman). Brevemente, las muestras se incubaron en presencia de la enzima nitrato reductasa y del cofactor NADPH. Esta enzima reduce a nitritos los nitratos presentes, a través de la siguiente reacción:



permitiendo su combinación posterior con los reactivos de Griess, la cual no es posible a partir de nitratos.

Luego de 3 horas de incubación a 37°C se agregan los reactivos de Griess 1 y 2 (Sulfanilamida en HCl 2 M y N-(1-Naftil)-etilendiamina en HCl 2 M) La combinación de las moléculas de nitritos con el reactivo de Griess 1 y posteriormente con el reactivo 2 da lugar a la formación de un azo-compuesto, producto cromogénico, cuya absorbancia puede leerse a 540 nm en un espectrofotómetro. Las lecturas de absorbancia se extrapolan en curvas realizadas con cantidades conocidas de nitratos y nitritos. Se expresaron los resultados como nmoles de nitratos y nitritos por mg de proteína embrionaria.

Análisis del metabolismo lipídico

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE LÍPIDOS EMBRIONARIOS

En la preparación de las muestras, se incubaron 7 embriones por muestra en 1 ml de KRB en un baño metabólico con agitación, con temperatura y gaseo controlados, en presencia o ausencia de 1 y 30 nM de leptina. Luego de 3 horas se reservaron los embriones a -70°C hasta el momento de realizar la extracción lipídica, la cual fue llevada a cabo por el método de Blight y Dyer. (Blight y Dyer 1959) Se sonicaron las muestras en 200 µL de PBS y se reservó una alícuota para la cuantificación de proteínas. Los 180 µl remanentes fueron sometidos a dos extracciones con 3.5 ml de la mezcla de solventes Blight y Dyer (metanol: cloroformo 2:1). Se particionó el volumen de extracción con 1 ml de agua y 1 ml de cloroformo, y luego de centrifugadas las muestras, se descartó la fase superior acuosa, evaporándose la fase orgánica a sequedad en un equipo concentrador. El residuo se reconstituyó con 0.5 ml de mezcla Blight y Dyer.

Las distintas especies lipídicas se separaron mediante cromatografía en capa delgada. Para ello se utilizaron placas de sílica previamente lavadas con acetona. Se procedió al sembrado de las muestras y de mezclas testigo de las especies lipídicas a analizar en cantidades conocidas. Para proceder a la separación, se utilizó una mezcla de solventes consistente en hexano: éter: ácido acético 80:20:2 v:v:v. Las placas se

desarrollaron y posteriormente se reveló la presencia de las distintas especies lipídicas en presencia de vapores de yodo. El yodo se combina con las moléculas hidrofóbicas, evidenciando la presencia de los lípidos por la aparición de manchas marrones. Estas imágenes fueron digitalizadas por medio de un escáner y se procedió al análisis de la intensidad y área de las manchas utilizando el programa de computación Sigmagel. Los valores obtenidos se refirieron a la curva realizada con las lecturas de las imágenes obtenidas de las distintas especies lipídicas sembradas en cantidades conocidas. Los resultados se expresaron como μg lípido por mg proteína embrionaria.

DETERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS LIPÍDICA *DE NOVO* EMBRIONARIA

Para dicha evaluación, las muestras se incubaron en baño metabólico, tal como se describiera previamente (4 embriones en 1 ml de KRB) con el agregado de [^{14}C -acetato] ($1\mu\text{Ci}$ con una actividad específica de 53 mCi/mmol), en presencia o ausencia de 1 o 30 nM de leptina. Al cabo de 3 horas se lavaron repetidamente los embriones con KRB hasta que no se detectara radioactividad en el producto de lavado, y se conservaron los embriones a -70°C para la posterior cuantificación de la incorporación de radioisótopos a las especies lipídicas, reflejando la síntesis lipídica embrionaria *de novo*.

Como paso previo a la determinación, se sonicaron las muestras en $200\ \mu\text{L}$ de PBS, se reservó una alícuota para la cuantificación de proteínas y $180\ \mu\text{l}$ se sometieron a la extracción lipídica ya detallada. Asimismo, antes de proceder al sembrado de las muestras, se separó una alícuota del residuo reconstituido para la cuantificación de la radioactividad total incorporada a la masa lipídica. Se sembraron las muestras, se desarrollaron las placas de la manera mencionada previamente y se identificaron las especies lipídicas mediante el revelado con vapores de yodo. Las zonas ocupadas por las especies lipídicas radioactivas fueron recuperadas por raspado de la placa y recolección de la sílica en viales apropiados. La sílica así obtenida fue disuelta en una mezcla de metanol: agua 1:1 v:v y se adicionó líquido de centelleo para la cuantificación de la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

La cuantificación se realizó refiriendo el porcentaje de radioactividad adquirida por cada especie lipídica a la radioactividad total incorporada a todas ellas. Los resultados fueron expresados como dpm por μg de proteína.

Determinaciones en Tejido Placentario

Obtención del tejido placentario de rata

Las ratas se sacrificaron el día 21 de preñez por dislocación cervical. Posteriormente se realizó la histerectomía y en un recipiente con medio KRB a 4°C, se abrió el útero y seccionó el cordón umbilical, separando así cada feto de su placenta. Luego de quitar los restos de membranas, se pesaron en balanza apropiada los fetos y placentas por separado. Se fraccionó el tejido placentario en explantes de 100 ± 10 mg de peso húmedo, cortado de manera de abarcar todas las zonas placentarias (decidua, placa coriónica, zona de trofoblastos gigantes, zona de unión y laberinto). Posteriormente, los explantes fueron procesados, incubados, y/o reservados a -70° C para realizar las determinaciones que más abajo se detallan.

Preparación del tejido placentario humano

La placenta de mujeres obtenida a término en la forma ya detallada, fue procesada de la siguiente manera: Se quitaron las membranas y se separó el tejido de la placa coriónica, los cotiledones fueron después lavados con solución fisiológica a 4° C, se retiró el tejido decidual y se eliminaron los vasos sanguíneos y el tejido fibrótico. Posteriormente, el tejido fue procesado, incubado y/o reservado a -70° C, para realizar las diferentes determinaciones más abajo detalladas.

Determinación de proteínas

La determinación de proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford (Bradford y col 1976) Previamente a las determinaciones realizadas en el tejido placentario, éste se homogeneizó en 1 mL de la solución del ensayo correspondiente, y 100 μ L del homogenato se diluyeron 1:5 en la misma solución. Luego se tomó 10 μ L en 1 ml del reactivo de Bradford diluido 1:5 en solución salina. Paralelamente se realizó una curva estándar utilizando cantidades conocidas de albúmina en el mismo reactivo de trabajo.

Luego de 5 minutos se forma un compuesto cromogénico cuya densidad óptica se puede leer a 595 nm. Extrapolando las densidades ópticas de las muestras con las de la curva de cantidades conocidas se obtuvieron los valores de proteínas de las muestras que se expresaron por mg o μg .

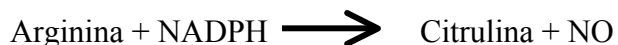
Determinación del contenido de leptina

Se homogeneizó el tejido placentario en 1 ml de ácido acético 6%, se centrifugó el homogenato, se lo llevó a 100° C durante 10 minutos y se sembró el sobrenadante en columnas Sep-Pack C-18, activadas con metanol y agua acidificada (pH:3). Se lavó el material inespecífico contenido en las columnas con una solución de ácido trifluoroacético al 0.1 %. Posteriormente se eluyó el material retenido por medio de una mezcla de metanol: agua: trifluoroacético (90:10:0.1) (v: v: v). Se evaporó el eluato en un equipo concentrador y luego se reconstituyó en el solvente de ensayo del equipo de determinación inmunoenzimática, basada en el doble sándwich previamente detallado. La cuantificación del contenido de leptina se realizó con los equipos comerciales de Assay Design para leptina humana y leptina de rata, según lo detallado para la determinación de la leptinemia. Brevemente, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario, luego con el secundario, y posteriormente con el sustrato. La peroxidasa acoplada al segundo anticuerpo cataliza la reacción de oxidación del sustrato, y el producto es una sustancia cromogénica cuya densidad óptica se lee a 450 nm. Los resultados se expresaron como pg de leptina por mg de proteína placentaria.

Evaluación del metabolismo nitridérgico

ACTIVIDAD ÓXIDO NITRICO SINTASA

La técnica se basa en la reacción que cataliza la NOS:



Se producen cantidades estequiométricas de citrulina y NO; de esta manera, la citrulina radioactiva sintetizada a partir de [^{14}C -arginina] refleja la cantidad de NO producido por el tejido, y permite inferir, por lo tanto, la actividad de su enzima de síntesis. Para inhibir las arginasas tisulares que pueden dirigir el metabolismo del sustrato hacia el ciclo de la urea, se suministra valina (un inhibidor de estas enzimas) a la mezcla de reacción.

Los explantes placentarios se homogeneizaron en 0.5 mL de medio HEPES 20 mM conteniendo DTT 1mM, valina 20 mM y CaCl₂ 0.45 mM, pH: 7.4. El homogenato se preincubó por 10 minutos a 37° C en baño metabólico en presencia o ausencia de leptina. Posteriormente se agregó 20 µL de una dilución 1:10 de la solución madre de [¹⁴C-arginina] (0.2 µCi, 292 mCi/mM) y NADPH. Se volvió a incubar durante 15 minutos a 37° C y luego se centrifugó durante 15 minutos a 2.000 g. El sobrenadante fue sometido al contacto con resinas de intercambio iónico capaces de retener la citrulina radioactiva, producto de la reacción anterior.

Preparación de las columnas

Se disolvió la resina DOWEX en agua destilada y se armaron columnas en pipetas tipo Pasteur, logrando una altura uniforme. Estas columnas fueron lavadas con medio Hepes 20 mM, y a cada una se les agregó 20 µL de citrulina 100 mM. A continuación se adicionó el sobrenadante correspondiente al centrifugado de las muestras, se eluyó el contenido de las columnas con 0.5 ml de agua destilada y se recogió en tres viales. Los eluatos contienen citrulina radioactiva proveniente de la reacción catalizada por la NOS, ya que los sitios de unión de la citrulina en la columna fueron ocupados con citrulina no radioactiva antes del pasaje de la muestra. La [¹⁴C-arginina] remanente, en cambio, sí queda retenida en las columnas, de manera que la radioactividad que contiene el eluato proviene únicamente de la citrulina. Sin embargo, se realizó en cada experimento una prueba para descartar radioactividad inespecífica, agregando a una columna 20 µl de [¹⁴C-arginina] (0.2 µCi). La radioactividad presente en el eluato de esta columna se restó de aquélla proveniente de las muestras.

Cuantificación de las dpm

Cada eluato fue mezclado con 10 mL de líquido de centelleo y se cuantificó la radioactividad presente en cada muestra utilizando un contador de centelleo para emisiones β. Teniendo en cuenta la eficiencia del aparato (93%), las cpm obtenidas fueron expresadas como dpm. Conociendo la actividad específica de la [¹⁴C-arginina], se expresó el resultado final como pmoles de NO producidos por minuto por 100 mg de tejido placentario.

NIVELES DE NITRATOS/NITRITOS PLACENTARIOS

Dado que el NO tiene vida media corta, y rápidamente da lugar en los tejidos a la formación de nitratos y nitritos, se considera al dosaje de nitratos/nitritos como un índice de producción de NO tisular.

Las muestras fueron preparadas mediante incubación de los explantes placentarios en 1 ml de medio KRB, en presencia o ausencia de leptina en concentraciones 1 y 30 nM. La incubación fue realizada en un baño metabólico en agitación a 37°C, con gaseado permanente de CO₂ y O₂ en proporciones 5:95. Luego de 3 horas de incubación se conservó el tejido a -70°C. Previo al ensayo, el tejido se homogeneizó en 1 mL de buffer TRIS 100 mM pH 7.4, se reservó una muestra para medir proteínas y se centrifugó el homogenato. Se tomaron 40 µL del sobrenadante para realizar el ensayo utilizando el equipo comercial de Cayman, tal como se describe en las instrucciones del comerciante y según se detalla para el dosaje de nitratos/nitritos embrionarios. Brevemente, se incubó la muestra con la enzima nitrato reductasa y el cofactor NADPH, luego se agregaron los reactivos de Griess 1 y 2 (Sulfanilamida en HCl 2 M y N-(1-Naftil)-etilendiamina en HCl 2 M) El producto de la combinación de la molécula de nitrito con el reactivo de Griess 1 y posteriormente con el reactivo 2 da lugar a la formación de un azo-compuesto, producto cromogénico, cuya absorbancia puede leerse a 540 nm en un espectrofotómetro. Las lecturas de absorbancia se extrapolaron en curvas realizadas con cantidades conocidas de nitratos y nitritos. Los resultados se expresaron como nmoles de nitratos y nitritos por mg de proteína placentaria.

Análisis del metabolismo lipídico

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE LÍPIDOS PLACENTARIOS

En la preparación de las muestras, los explantes placentarios se incubaron en un baño metabólico con agitación en 1 mL de KRB con temperatura y gaseo controlados sin agregado (basal) o con agregado de leptina 1 nM, leptina 30 nM, NMMA 600 µM (inhibidor de la NO sintasa) o NP 600 µM (dador de NO). Luego de 3 horas se conservó el tejido a -70° C hasta el momento de realizar la extracción lipídica. Ésta se realizó por el método de Blight y Dyer. (Blight y Dyer 1959) Se homogeneizaron las muestras en 1000 µL de PBS, de los cuales 500 µL se sometieron a dos extracciones con 3.5 mL de la mezcla de solventes Blight y Dyer (metanol: cloroformo 2:1). Se particionó el volumen de extracción con 1 mL de agua y 1 mL de cloroformo, y posterior centrifugado, se descartó la fase superior acuosa y la fase orgánica se evaporó a sequedad en un equipo concentrador. El residuo se reconstituyó con 1 mL de mezcla Blight y Dyer.

Las distintas especies lipídicas se separaron mediante cromatografía en capa delgada. La misma se realizó en placas de sílica, previamente lavadas con acetona, donde se procedió al sembrado de las muestras y de la curva estándar conteniendo cantidades conocidas de las distintas especies lipídicas a analizar. Se sembró un volumen equivalente a 250 µg de proteína placentaria. La mezcla de solventes para el desarrollo de la placa fue hexano: éter: ácido acético en partes 80:20:2 v:v:v. Las placas se desarrollaron y posteriormente se reveló la presencia de las distintas especies lipídicas con vapores de yodo, en forma semejante a la ya descrita en la evaluación de los niveles lipídicos embrionarios. Una vez identificada la presencia de los lípidos se digitalizó la imagen por medio de un escáner y se procedió al análisis de la intensidad y área de las manchas mediante el programa de análisis de imágenes Sigmagel. Los valores obtenidos se extrapolaron en una curva estándar realizada para cada una de las especies lipídicas evaluadas. Los resultados se expresaron como µg de lípido por mg de proteína placentaria.

DETERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS LIPÍDICA *DE NOVO* PLACENTARIA

En la preparación de las muestras, el tejido placentario se incubó en baño metabólico tal como se describiera previamente, en 1 ml de KRB en presencia o ausencia de leptina, NMMA (inhibidor de la NOS), NP y SP (dadores de NO), en este caso con el agregado de [¹⁴C-acetato] (1.6 µCi, actividad específica 53 mCi/mmol). Al cabo de 3 horas se lavó el tejido con KRB “frío” hasta que no se detectara radioactividad en el producto de lavado y se guardó el tejido a -70° C para la posterior determinación de incorporación de acetato marcado a las diferentes especies lipídicas, indicadora de síntesis lipídica *de novo*. Se homogeneizaron las muestras en 1000 µL de PBS, y 500 µl se sometieron a la extracción lipídica ya detallada.

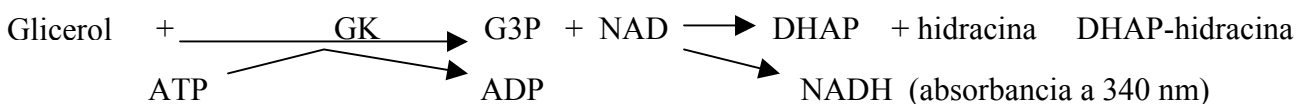
Previamente al proceso de sembrado, se separó una alícuota de 50 µl del residuo reconstituido para la cuantificación de la radioactividad total incorporada a la masa lipídica. Se sembraron las muestras, se desarrollaron las placas de la manera mencionada previamente y se identificaron las especies lipídicas mediante el revelado con vapores de yodo. Las zonas ocupadas por los lípidos radioactivos fueron recuperadas por raspado de la placa y recolección de la sílica en viales apropiados. El producto de raspado fue disuelto en una mezcla de metanol: agua 1:1 v:v y se adicionó líquido de centelleo para la cuantificación de la radioactividad en un contador de centelleo líquido.

Para los cálculos se refirió el porcentaje de radioactividad adquirida por cada especie lipídica a la radioactividad total incorporada a todos los lípidos. Los resultados fueron expresados como dpm por μg de proteína.

DETERMINACIÓN DEL CATABOLISMO LIPÍDICO PLACENTARIO

En la preparación de las muestras, los explantes placentarios se incubaron en un baño metabólico con agitación en 1 ml de KRB con temperatura y gaseo controlados sin agregados (basal) o con agregado de leptina 1 y 30 nM. Luego de 3 horas se conservó el medio de incubación a -20°C para realizar el dosaje de glicerol, producto de hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos, y por lo tanto, índice de catabolismo lipídico. (Frühbeck y col 2001 a) El tejido incubado se guardó a -70°C para la cuantificación de proteínas.

La técnica de medición del glicerol utiliza la diferencia en las absorbancias específicas entre nicotinamida adenín dinucleótido (NAD) y del nicotinamida adenín dinucleótido reducido (NADH). La forma reducida del dinucleótido (NADH) absorbe a una longitud de onda de 340 nm mientras que la forma oxidada (NAD), no lo hace. (Young y col 1988, Spinella y col 1966) El glicerol es modificado de manera enzimática para producir di-hidroxiacetona fosfato (DHAP), proceso en el cual se reduce el NAD, quedando NADH, producto que se cuantifica. Las reacciones que se llevan a cabo son dos, una de fosforilación y otra de oxidación. Como se esquematiza a continuación, el glicerol se fosforila por la gliceroquinasa (GK), quedando glicerol 3 fosfato (G3P), luego la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH) cataliza una oxido-reducción que oxida al G3P a DHAP y reduce el NAD a NADH. Se suministra NAD en exceso de manera que el sustrato limitante de la reacción sea el glicerol y de esta forma cuantificarlo a través de la cuantificación del NADH. Se agrega además hidracina, que “secuestra” a la DHAP, favoreciendo la formación de nuevo producto.



Preparación del reactivo de trabajo: Se preparó la solución de hidrato de hidracina al 20 % v/v en agua bidestilada y se le adicionó sustratos, cofactores, y enzimas de la reacción de manera de obtener una

solución de: glicina 1.5 %, $MgCl_2$ 0.04 %, ATP 0.075 %, NAD 0.036 % (p/v), 21.25 unidades de gliceroquinasa, y 200 unidades de gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH).

Se adicionó 1 ml del reactivo de trabajo a 200 μ L de cada muestra y a 200 μ L de una curva conteniendo cantidades conocidas de glicerol. Se lo dejó reaccionar durante 45 minutos a temperatura ambiente y luego se leyó la absorbancia a 340 nm. La concentración de glicerol se extrapoló de la curva. Se expresaron los resultados como nmoles de glicerol por mg de proteínas.

Inmunolocalización de leptina, receptor de leptina, iNOS y eNOS

Las placentas de ratas control y diabéticas se cortaron longitudinalmente por la mitad y se fijaron en formaldehído 4 % en PBS durante 24 hs, luego de lo cual se preservaron en etanol: agua (70:30) (v: v) a 0° C hasta el momento de su inclusión en parafina.

Inclusión en parafina

El tejido placentario fijado fue deshidratado sometiéndolo a los siguientes solventes: etanol 95%, por 20 minutos; etanol 100% por 15 minutos y dos veces benceno por 10 minutos cada uno. Posteriormente se los sumergió en parafina líquida a 56° C y se los dejó en estufa con temperatura controlada durante 18 horas. Luego de este periodo se las dispuso en cubos de parafina líquida y se las dejó solidificar a temperatura ambiente.

Una vez incluidos se armaron los tacos y se realizaron cortes seriados longitudinales de 5 micrones de grosor por medio de un micrótopo. Los cortes fueron situados en portaobjetos previamente tratados con el adhesivo Vecta-Bond. para evitar que los mismos se despeguen. En un mismo portaobjetos se situaron cortes de placenta de rata control y de rata sana.

Marcación con anticuerpos

Los cortes se desparafinaron mediante 2 exposiciones a xilol, de 20 minutos de xilol para deparafinar. Luego, se re-hidrató el tejido fijado mediante tratamientos con xilol: etanol (1:1) (v: v) 15 minutos, y etanol 100 %, 96% y 70% por períodos de 10 minutos. La hidratación se completó con PBS durante 10 minutos. Se bloquearon las peroxidasas endógenas con una solución 6% de peróxido de hidrógeno durante 5 minutos. Se trataron los cortes con anticuerpos y bloqueantes adecuados para cada antígeno de la siguiente manera.

Inmunomarcación de leptina: Se bloquearon los sitios inespecíficos con una solución al 1% de suero de cabra en PBS-tritón (0.2 %). Posteriormente se agregó el primer anticuerpo, un anticuerpo policlonal contra leptina obtenido en conejo y diluido 1:500 (v: v) en PBS. Se incubó en cámara húmeda a 4°C durante 24 horas. Luego de ese periodo se lavó el anticuerpo primario excedente y se incubó durante 1 hora con el anticuerpo secundario, una solución 1:50 (v: v) en PBS de anticuerpo anti-conejo hecho en cabra. Posteriormente se adicionó el complejo soluble PAP-conejo como se ha descrito para la inmunomarcación de embriones, diluido 1:80 (v: v) en PBS durante 1 hora. Se realizaron lavados y luego se reveló la presencia de leptina por la adición del sustrato DAB 6% (p/v) en TRIS 0.06 M pH: 7.4 y peróxido de hidrógeno 0.01%. La reacción fue seguida bajo microscopio. Se dejó interactuar durante 20 minutos, se paró la reacción con agua y se lavó el exceso de sustrato y producto cromogénico con PBS. Por último se realizó una contratinción de núcleos con hematoxilina, dejando interactuar durante 50 segundos.

Inmunomarcación de receptor de leptina: El proceso fue realizado de la manera detallada para la detección de leptina, pero se utilizó suero de burro al 1% en PBS-tritón (0,2%). El anticuerpo primario fue un anticuerpo policlonal desarrollado en cabra en una dilución 1:500 en PBS. El anticuerpo secundario fue anti-inmunoglobulina de cabra, desarrollado en burro y diluido 1:50 en PBS. Se utilizó como tercer componente una dilución 1:100 (v: v) de PAP-cabra y como sustrato DAB realizando el revelado de la manera indicada para la detección de leptina.

Inmunodetección de iNOS y de eNOS: Se siguió el procedimiento descrito para la marcación de leptina y su receptor. En estos casos los anticuerpos primarios fueron monoclonales y desarrollados en ratón. Cada anticuerpo primario se utilizó diluido 1:250. El suero bloqueante consistió en una dilución 1:100 de suero de cabra en PBS-tritón (0.2%). Se utilizó un anticuerpo secundario anti-ratón desarrollado en cabra (1:50 en PBS) y como tercer componente el complejo PAP-ratón diluido 1:100 en PBS. El proceso de revelado por oxidación del DAB fue seguido bajo microscopio y se dejó interactuar durante 45 minutos.

En todos los casos se realizó el control negativo correspondiente sin agregar el anticuerpo primario.

Posteriormente se sometieron los cortes a una sucesión de solventes para la deshidratación del tejido. (Etanol 70 %, etanol 96%, etanol 100%, etanol: xilol 1:1) durante 3 minutos y xilol 100% durante 5 minutos y se fijaron cubreobjetos por encima del tejido por medio del fijador Entellan. (Sigma) Una vez

obtenidos los cortes marcados se evaluó la densidad de marca por un programa analizador de imágenes (Image Pro Express 4.5)

Cultivo Primario de Trofoblastos

Se procesó el tejido siguiendo la técnica de H. Klimann (Klimann y col 1986).

El tejido placentario se liberó de membranas coriónica y amniótica, y se separaron los cotiledones. Cada uno de ellos fue lavado con solución fisiológica a temperatura ambiente, para eliminar la sangre. Posteriormente mediante pinzas y tijeras se separaron los vasos sanguíneos, regiones fibróticas y decidua en caso de existir restos de la misma.

El tejido fue pesado y explantes de 35 g fueron sometidos a tres periodos de digestión con Desoxirribonucleasa tipo I (que degrada DNA residual) y Tripsina (que permite la ruptura de las uniones intercelulares), disueltas en solución HANK'S libre de calcio y magnesio, obteniéndose de esta forma una suspensión celular. Se trabajó intensamente en el ajuste de las unidades de actividad de las enzimas a utilizar. De acuerdo a los resultados obtenidos, se fijaron las siguientes condiciones:

Digestión	Desoxirribonucleasa I (unidades)	Tripsina (unidades)	ml de medio Hank's	minutos
1 ^a	56 000	1.275.000	150	25
2 ^a	37 500	825.000	100	25
3 ^a	28 000	525.000	75	25

Luego de cada digestión, la suspensión de células liberadas se sembró sobre un lecho de suero de cabra, lo que permitió hacer una primera separación por densidad y eliminar gran parte de células muertas y productos de degradación.

Los precipitados se resuspendieron en medio de cultivo y esta suspensión se sembró en un gradiente discontinuo de Percoll variable entre un 70 y un 5 % con intervalos de 5%. Posteriormente se realizó la separación por densidad mediante centrifugación (15 minutos a 3000 rpm).

Rendimiento obtenido: Una vez lavada la suspensión celular obtenida del gradiente, se cuantificó el rendimiento del proceso, obteniéndose entre 30 y 50 x 10⁶ células por cultivo. En todas las suspensiones se obtuvo un 90 % de viabilidad celular.

Los trofoblastos crecen adheridos a la superficie de cultivo, inicialmente como células mononucleares y a medida que adquieren el fenotipo sincicial se fusionan entre sí; por este motivo la cantidad de células que se siembran constituye un factor crucial en el desarrollo del cultivo. Se ha establecido como criterio sembrar 1.5 x 10⁶ células por pozo de 7 cm², y proveer un volumen de 2 mL de medio a cada pozo.

Se realizaron seguimientos periódicos de los cultivos, con cambios de medio cada 24h. Durante este proceso se observó diariamente el cambio fenotípico: la formación de sincicios.

Para proceder al estudio de la influencia de leptina sobre el metabolismo trofoblástico, se trabajó en medio libre de suero fetal bovino. Se realizaron los cultivos estabilizándolos y permitiendo su fijación a la placa en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino las primeras 48 hs; luego se realizó el cambio a un medio rico sin suero (DMEM/F12) y se realizó la adición de leptina en las concentraciones correspondientes 1, 30 y 60 nM. A las 24 hs. del agregado de leptina y 72 hs de cultivo se colectó el medio y las células. Se midió proteínas en el lisado celular y glicerol como índice de catabolismo lipídico en el medio de cultivo.

Obtención del lisado celular: Cada monocapa fue tratada con 0.5 mL de una solución 0.5M de NaOH a 0°C y se resuspendió varias veces, se reservó a -20° C hasta el momento de la determinación de proteínas.

Determinación de proteínas: Se realizó mediante la técnica de Bradford ya descrita. (Bradford y col 1976) 10 µL de cada lisado se agregaron a 1 mL de reactivo de trabajo y luego de 5 minutos se evaluó la densidad óptica y se extrapoló este valor en una curva de cantidades crecientes y conocidas de albúmina.

Obtención de los medios: Se obtuvieron los 2 mL de medio condicionado de cada pozo y se conservó a -20°C hasta el momento de la cuantificación de glicerol como índice de la lipólisis trofoblástica. La determinación del glicerol presente en el medio condicionado se realizó de la manera descrita para los medios de incubación de placenta de rata y humana.

Estadística:

Los resultados se expresan como promedio \pm error estándar. Las comparaciones entre grupos se realizan empleando el test t de Student al comparar dos grupos de valores, y análisis de varianza (ANOVA) al comparar más de un tratamiento, evaluados con el test de Tukey. Los resultados expresados como porcentajes se comparan mediante test de Chi-cuadrado. En todos los casos la diferencia entre medias se considera significativa cuando el valor de p es menor o igual que 0.05.

n=número de muestras provenientes de animales diferentes.

Resultados

Características del modelo de Diabetes

El modelo de diabetes moderada empleado se obtiene en ratas por inyección neonatal s.c. de estreptozotocina. Esta es una droga de alta especificidad y toxicidad para las células β del páncreas. (Maldonato y col. 1976) La administración de esta droga en el período neonatal produce una destrucción de células β pancreáticas y posterior regeneración parcial, característica de esta etapa temprana. (Portha y col 1979) El páncreas endocrino parcialmente regenerado en el animal adulto, se desarrollará con limitaciones funcionales debidas a una población de células β reducida. Nuestros resultados muestran (Tabla 1) que si bien los niveles basales circulantes de insulina no están reducidos, la capacidad de respuesta insulínica frente a un estímulo es insuficiente. Es por esta razón que luego de una sobrecarga de glucosa de 1.5 g/kg (i.p.) no se observa un aumento significativo de la insulinemia en ratas diabéticas y sí se observa este aumento en los animales control ($p < 0.001$). En efecto, la insulinemia post administración es significativamente menor en los animales diabéticos que en los animales sanos ($p < 0.05$). Los valores basales de glucemia de las ratas diabéticas se encuentran incrementados ($p < 0.001$) con respecto a los animales control.

Es interesante destacar la importancia del estudio utilizando este modelo de diabetes, en el cual los valores glucémicos se corresponden con aquellos frecuentemente observados en la Diabetes Mellitus humana, incluso bajo tratamiento, dada la dificultad en el control metabólico estricto que acarrea esta patología. Debido al interés particular que tiene la leptina en este trabajo de tesis, se determinó la leptinemia, encontrándose disminuidos sus valores en las ratas diabéticas ($p < 0.05$) (Tabla 1).

Tabla 1: Valores de insulina, glucosa y leptina en sangre de rata sana y diabética.

	Control (n=7)	Diabética (n=7)
Insulinemia (nmol/L)		
Basal	0.53 ± 0.05	0.52 ± 0.07
Post- administración de glucosa	0.93 ± 0.05 ***	0.69± 0.09 Φ
Glucemia (mg/dL)	100 ± 10	215 ± 20 ***
Leptinemia (ng/mL)	1.39± 0.1	0.92 ± 0.14 *

*p<0.05, ***p<0.001 comparado con control basal

Φ p< 0.05 comparado con la insulinemia control post-administración de glucosa

Test estadístico: T-student

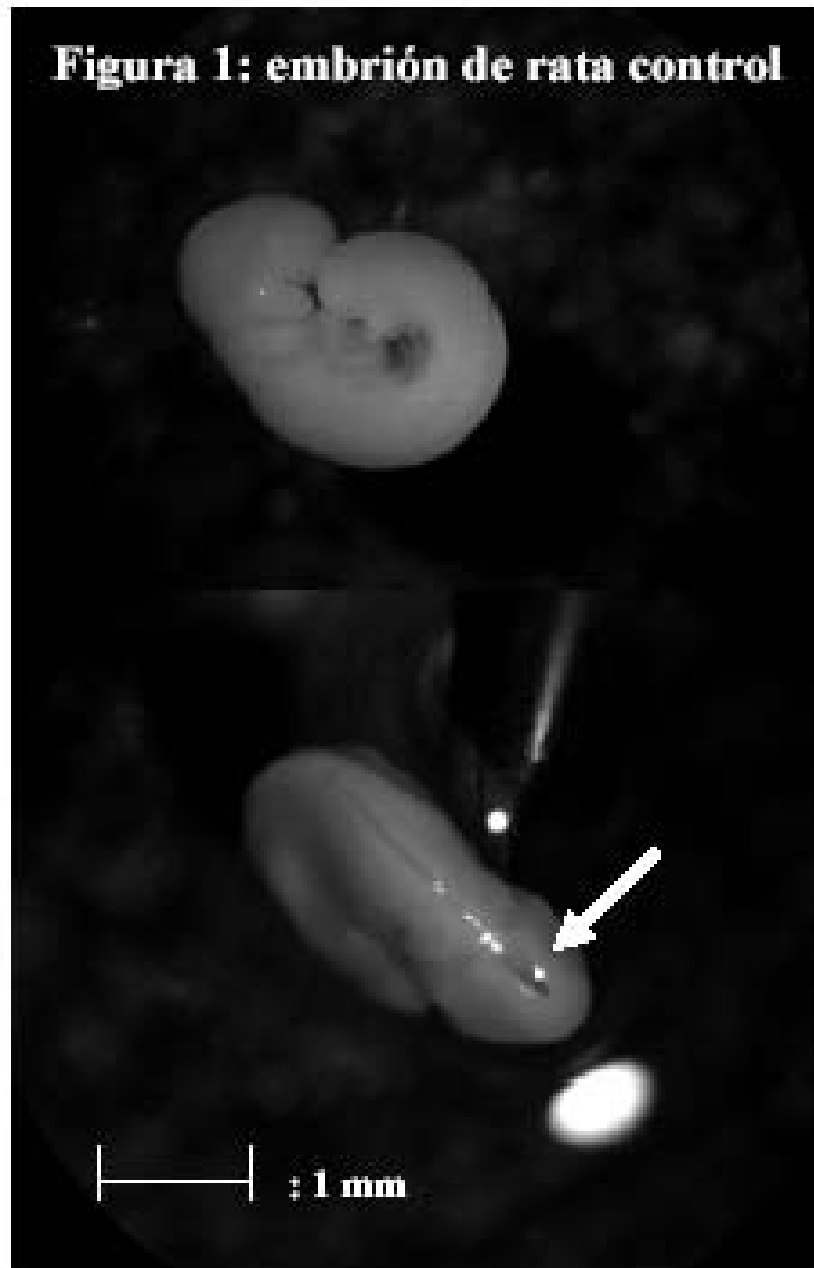
CAPITULO I: DESARROLLO Y METABOLISMO DEL EMBRIÓN DE RATA SANA Y DIABÉTICA DURANTE LA ORGANOGÉNESIS TEMPRANA: EFECTO DE LEPTINA

Efectos de la Diabetes sobre el desarrollo embrionario en la etapa de organogénesis temprana

El periodo de organogénesis temprana es el de mayor susceptibilidad para la inducción de malformaciones, donde ocurre el cierre del tubo neural, la cardiogénesis, la migración de células de la cresta neural y el desarrollo somítico. En esta etapa comienzan asimismo a formarse los primordios de múltiples órganos. Morfológicamente y bajo lupa puede determinarse en el día estudiado (10.5 de gesta) el desarrollo somítico, la rotación axial, el desarrollo cardíaco y el neural con sus pliegues neurales en aposición y ya próximo a su cierre a nivel cefálico.

El estudio morfológico del desarrollo embrionario en este período nos muestra que en las ratas diabéticas existe un menor número de embriones (p< 0.05) y un incremento en el porcentaje de reabsorción embrionaria con respecto al control (Tabla 2). Si bien el número de somitas no es

significativamente menor en los embriones de rata diabética, el retraso en el crecimiento se evidencia en la disminución del contenido proteico ($p < 0.01$). La morfología embrionaria también se encuentra claramente afectada por la diabetes: las ratas diabéticas presentan un aumento en el porcentaje de embriones con malformaciones congénitas ($p < 0.001$); las principales anomalías morfológicas se observan en el tubo neural (10%) (Tabla 2) como así también en el corazón (6%) y en la rotación sobre el eje axial, la cual sólo se detecta en un 8 % de los embriones, contra un 1% en el grupo control (Figura 1 y 2).



Día de gestación: 10.5. Aumento: 21 X



Día de gestación: 10.5. Aumento: 24 X. La flecha señala anomalías de cierre de tubo neural.

Tabla 2: Crecimiento y desarrollo morfológico de embriones de rata sana y diabética en día 10.5 de gestación.

	Control (n=13)	Diabética (n=13)	
Nº embriones/rata	13 ± 1	10 ± 1	p< 0.05
% reabsorciones	1 % (1 de 113 embriones)	11 % (15 de 136 embriones)	p<0.01
Nº de somitas/embrión	14 ± 2 (112 embriones)	12 ± 1 (121 embriones)	
Contenido proteico/embrión	67 ± 4	50 ± 2	p<0.01
% de malformaciones	1% (1 de 112 embriones)	14 % (17 de 121 embriones)	p< 0.001

Test estadístico: Chi-cuadrado (evaluación de porcentaje de malformaciones y de reabsorciones); t-Student (evaluación del número de embriones por rata, número de somitas por embrión y contenido proteico embrionario)

Efecto de la Leptina en el desarrollo del embrión de rata sana y diabética durante la organogénesis temprana

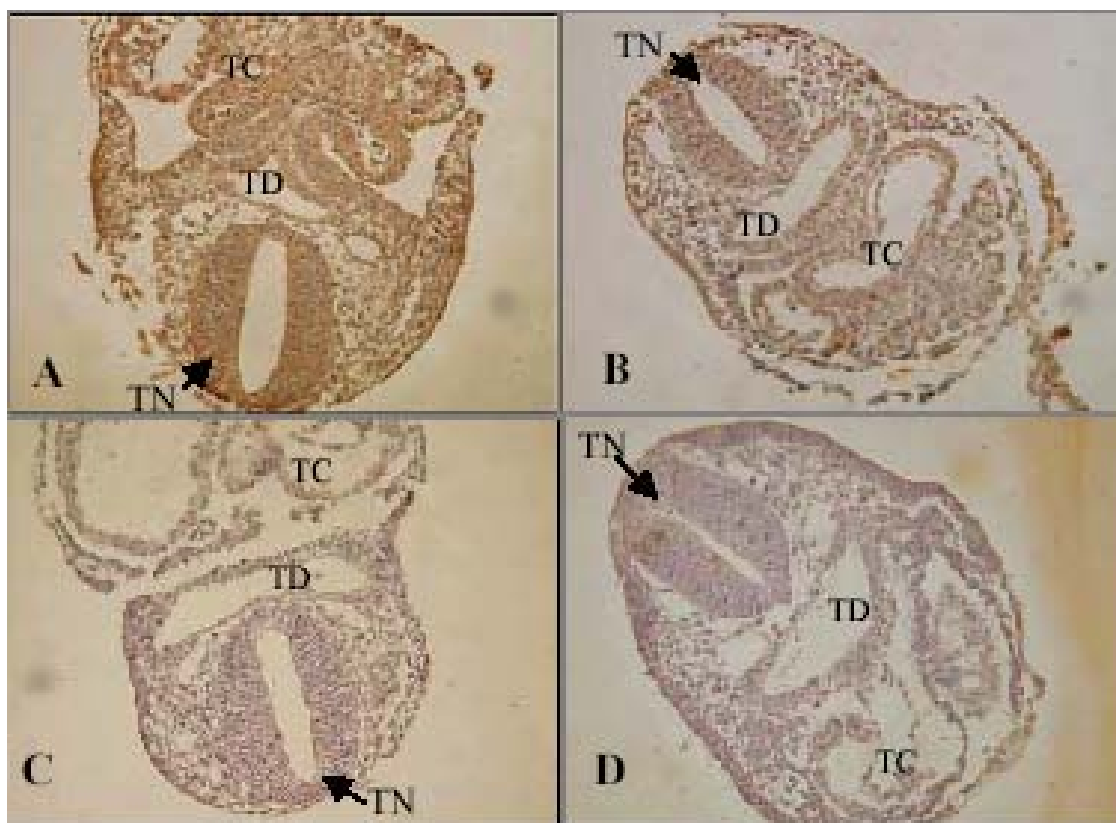
La leptina es una hormona peptídica secretada principalmente por el tejido adiposo que posee efectos sobre la regulación del metabolismo. (Mac Alister y col 2004) Su producción y secreción es modulada por insulina entre muchos otros factores. (Coya y col 2001) Si bien se ha demostrado la importancia de esta hormona para el desarrollo del embrión pre-implantatorio y en el proceso de implantación, no se ha dilucidado aún si esta hormona tiene injerencia en el embrión en desarrollo en etapas de organogénesis temprana. En esta parte del trabajo se determinó la presencia y localización de leptina y su receptor en el embrión de 10.5 días mediante inmunohistoquímica. Asimismo se evaluó el efecto de leptina sobre el crecimiento y desarrollo de cultivos *in vitro* de embriones de ratas sanas en etapa de organogénesis temprana. Dichos cultivos se realizaron en presencia de suero de rata sana y diabética con el agregado de distintas concentraciones de leptina.

Niveles e inmunolocalización de leptina embrionaria

Se observó presencia de leptina en cortes embrionarios de rata sana y diabética (Figura 3). La intensidad de marca en la inmunolocalización es menor en los embriones provenientes de ratas diabéticas (Figura 3 B) en relación al control (Figura 3 A). Esta observación fue corroborada por un análisis densitométrico realizado en 6 cortes embrionarios de 6 ratas sanas y 6 cortes embrionarios de 6 ratas diabéticas (Tabla 3).

Al realizar estudios de los niveles de leptina mediante enzoinmunoanálisis, observamos que dichos niveles están por debajo del límite de detección en embriones de 10.5 días de gestación. Sin embargo pudimos observar que en embriones de 13.5 días de gestación provenientes de rata diabética los niveles de leptina se encuentran disminuidos en relación al control ($p < 0.05$) (Figura 4).

Figura 3: Inmunolocalización embrionaria de leptina

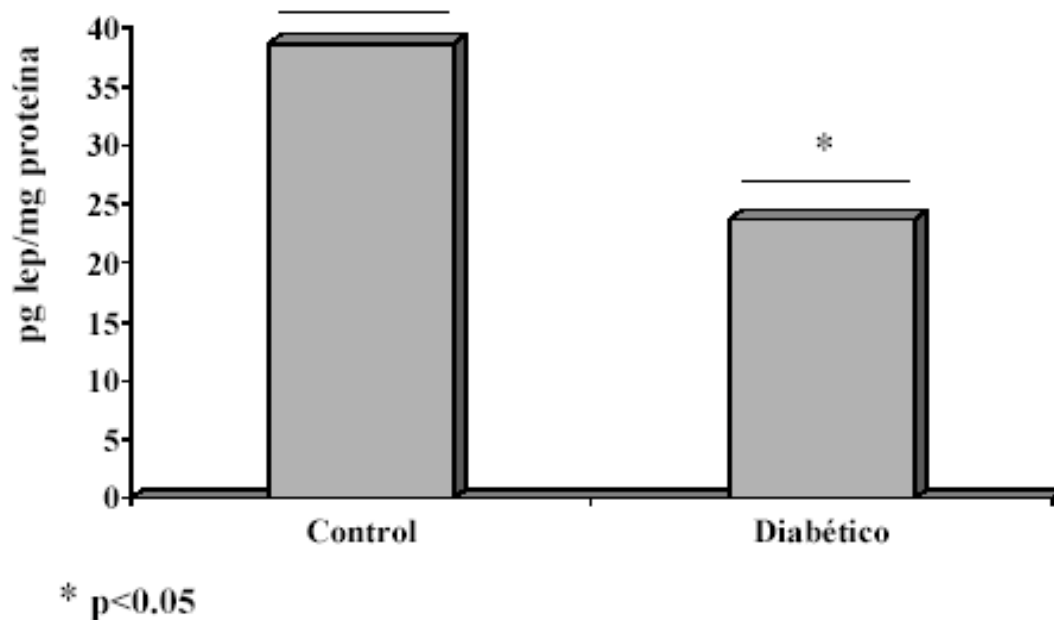


Determinación de leptina por inmunohistoquímica en corte de embrión de rata control (A) y corte de embrión de rata diabética (B). (C) y (D) son los controles negativos respectivos realizados en ausencia de anticuerpo primario. Se destaca la menor marcación de leptina en el embrión de rata diabética en relación al embrión de rata control. Aumento 200X. TN: tubo neural, TD: tubo digestivo, TC: tubo cardíaco.

Tabla 3: Análisis densitométrico de leptina en cortes embrionarios de rata sana y diabética.

Control	Diabético
0.42 ± 0.025	0.17 ± 0.011 ***
n=6	n=6

Los datos expresan el promedio ± error estándar de los valores densitométricos obtenidos en 6 cortes de embriones provenientes de animales diferentes en cada grupo experimental. Se realizaron 10 mediciones por corte en un área de $120 \mu\text{m}^2$. *** $p < 0.001$ comparado con el control. Test estadístico: t de Student.

Figura 4: Niveles embrionarios de leptina

Los datos expresan el promedio ± error estándar. En ambos grupos experimentales se utilizaron 8 muestras de 3 embriones cada una, provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: t-Student.

Efectos de la adición de leptina sobre el desarrollo y el crecimiento embrionarios

La técnica de cultivo de embriones en etapa de organogénesis temprana, desarrollada por New (New 1978) permite la evaluación *in vitro* del desarrollo somítico, cardíaco y neural. Los embriones se explantan en el día 9.5 de gesta, etapa de pliegue neural temprano, los embriones presentan 2 ó 4 somitas y no se observa desarrollo cardíaco. Los embriones se evalúan morfológicamente al cabo de 24 hs, etapa en la que el desarrollo debe ser similar al que se observa *in vivo* en el día 10.5 de gesta.

Nuestros resultados indican que entre un 56 y un 72% de los embriones cultivados crecen en estas condiciones. Se observa un retraso en el crecimiento de los embriones desarrollados en suero diabético con respecto a los desarrollados en medio control, evidenciado por el menor contenido proteico ($p < 0.05$); y también un mayor porcentaje de anomalías morfológicas ($p < 0.01$) (Tabla 4 A y B).

En los embriones desarrollados en presencia de suero de rata control, leptina 1 nM no modifica el porcentaje de malformaciones y el desarrollo somítico embrionario (Tabla 4 A). Sin embargo a concentraciones mayores, se observa un incremento en el porcentaje de anomalías embrionarias, principalmente de tubo neural (15%), aunque también cardíacas (5%) y de rotación axial (5%).

En embriones cultivados en presencia de suero de rata diabética, se observó que el desarrollo, en este caso, no se ve afectado por el agregado de leptina exógena (Tabla 4 B).

Tabla 4 A: Parámetros de crecimiento y de desarrollo morfológico de los embriones cultivados en medio enriquecido con suero de rata sana.

	Control	Control + lep 1nM	Control + lep 30nM
Porcentaje de Embriones desarrollados	45 de 71 62%	43 de 77 56%	20 de 28 71%
Anomalías del Tubo neural	1 de 45	2 de 43	3 de 20
Anomalías Cardiacas	1 de 45	2 de 43	1 de 20
Anomalías De rotación	0 de 45	3 de 43	1 de 20
Anomalías Totales	2 de 45 4.4 %	7 de 43 16 %	5 de 20 20 % p<0.05
Somitas	15 ± 2	13 ± 3	12.5 ± 3
Proteínas	64 ± 4	66 ± 6	69 ± 8

Test estadístico empleado para evaluar variaciones entre los valores mostrados como porcentajes: Chi-cuadrado. Se detalla en la tabla el número de embriones provenientes de 12 ratas en cada grupo experimental. Test estadístico que evalúa las diferencias entre los valores mostrados como promedios ± error estándar: t-Student. n= 12 ratas en cada grupo experimental.

Tabla 4 B: Parámetros de crecimiento y de desarrollo morfológico de los embriones cultivados en medio enriquecido con suero de rata diabética.

	Suero Diabético	Suero D + lep 1nM	Suero D + lep 30nM
Porcentaje de embriones desarrollados	49 de 81 61%	57 de 90 63%	29 de 42 72%
Anomalías del tubo neural	7 de 49	6 de 57	4 de 29
Anomalías cardíacas	6 de 49	5 de 57	4 de 29
Anomalías de rotación	1 de 49	1 de 57	0 de 29
Anomalías totales	14 de 49 28.6 % (p<0.01 vs. C)	6 de 29 21%	8 de 29 27 %
Somitas	12 ± 3	11 ± 3	11 ± 3
Proteínas	50 ± 5 (p< 0.05 vs. C)	46 ± 8	50 ± 6
Promedio de embriones desarrollados en suero control: 63.4%			
Promedio de embriones desarrollados en suero diabético: 65.3%			

Test estadístico empleado para evaluar variaciones entre los valores mostrados como porcentajes: Chi-cuadrado. Se detalla en la tabla el número de embriones provenientes de 12 ratas en cada grupo experimental. Test estadístico que evalúa las diferencias entre los valores mostrados como promedios ± error estándar: t-Student. n= 12 ratas en cada grupo experimental.

Metabolismo lipídico en el embrión de rata sana y diabética: Efecto modulador de la leptina

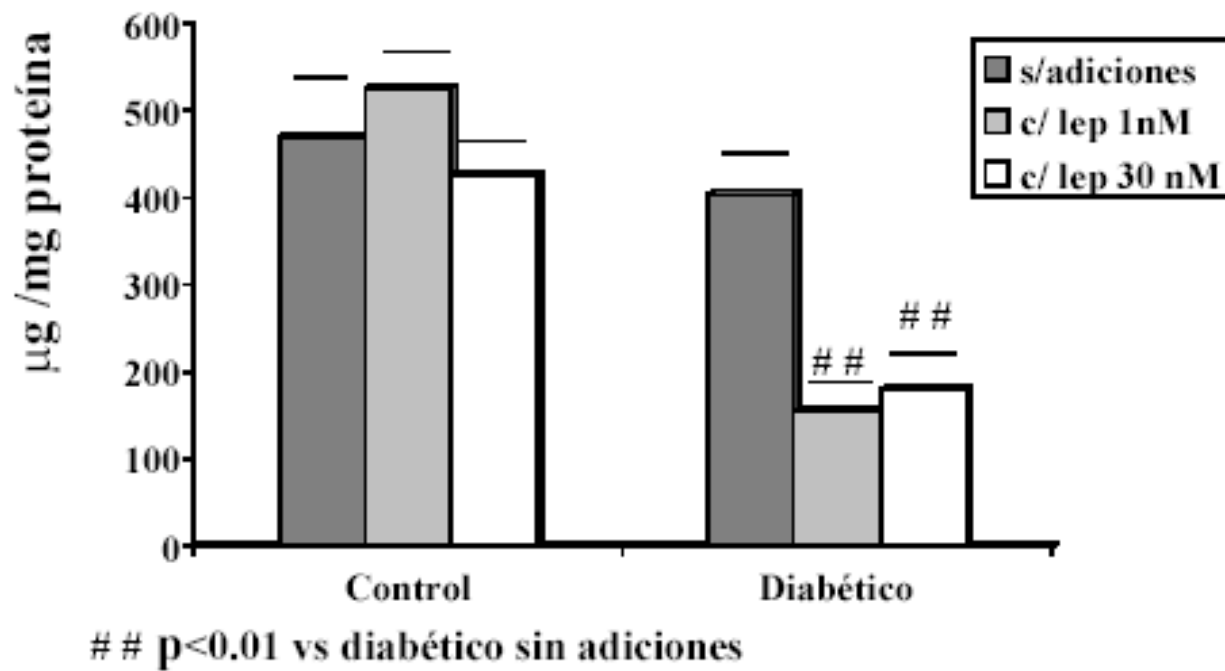
En el embrión, así como en los tejidos adultos, los lípidos actúan como factores nutricionales, componentes estructurales, señales inter e intra celulares así como señales a distancia. El metabolismo lipídico embrionario debe estar finamente regulado ya que de ello depende la formación de nuevas estructuras, la comunicación celular y la generación de energía. Nuestros trabajos previos muestran que a diferencia de lo que ocurre en modelos de diabetes más severa (Sinner y col 2003) los embriones provenientes de ratas con diabetes moderada no tienen diferencias en relación al control en cuanto al contenido de fosfolípidos, colesterol, triglicéridos y ésteres de colesterol. Sin embargo muestran una menor capacidad de síntesis *de novo* de triglicéridos y colesterol. (Jawerbaum y col 2002)

La leptina es un importante modulador del contenido lipídico en diversos tejidos, disminuyendo el contenido de lípidos cuando se la administra de forma exógena en experimentos *in vivo* o *in vitro*. (Frübehck y col 2002) (Frübehck y col 2001) En este trabajo se estudió el efecto que tiene el agregado de leptina exógena sobre el contenido lipídico en el embrión de rata sana y de rata con diabetes moderada. Con este objetivo se incubaron embriones provenientes de rata sana y diabética en baño metabólico a 37° C en presencia o ausencia de leptina 1nM y 30 nM. Se realizó entonces la extracción de lípidos embrionarios, los cuales se separaron mediante cromatografía en capa delgada; las placas se revelaron con vapores de yodo, y la intensidad y el área de las bandas obtenidas se cuantificaron mediante un analizador de imágenes.

Niveles lipídicos en embriones de rata sana y diabética: Efecto de leptina

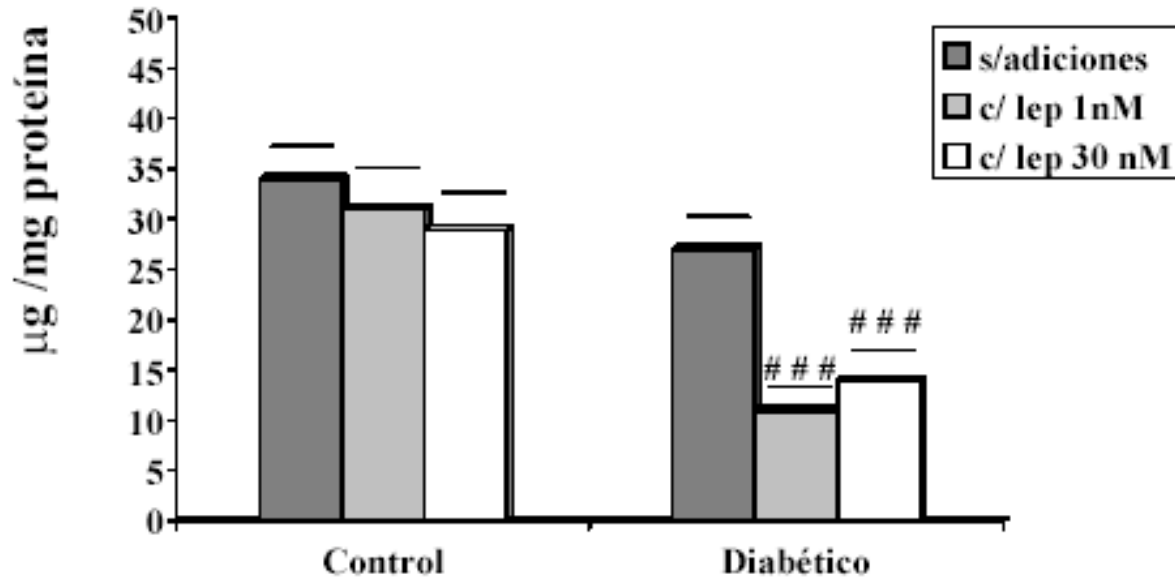
Observamos que el agregado de leptina exógena, 1 nM y 30 nM, concentraciones que han mostrado efectos moduladores sobre el desarrollo en embriones pre- implantatorios, (Swain y col. 2004) no modifica el contenido de fosfolípidos, colesterol, triglicéridos y ésteres de colesterol en embriones de rata sana (Figuras 5 a 8). Por el contrario, el estudio sobre embriones de rata diabética evidencia que la leptina es capaz de disminuir el contenido de sus lípidos. La menor concentración de leptina utilizada (1 nM) provoca una disminución en el contenido de colesterol ($p < 0.001$) y de fosfolípidos ($p < 0.01$), mientras que la adición de leptina 30 nM produce además una disminución en el contenido de ésteres de colesterol ($p < 0.01$) (Figuras 5 a 8).

Figura 5: Niveles de Fosfolípidos en embriones provenientes de rata sana y diabética. Efecto de leptina.



Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de 7 embriones cada una, provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

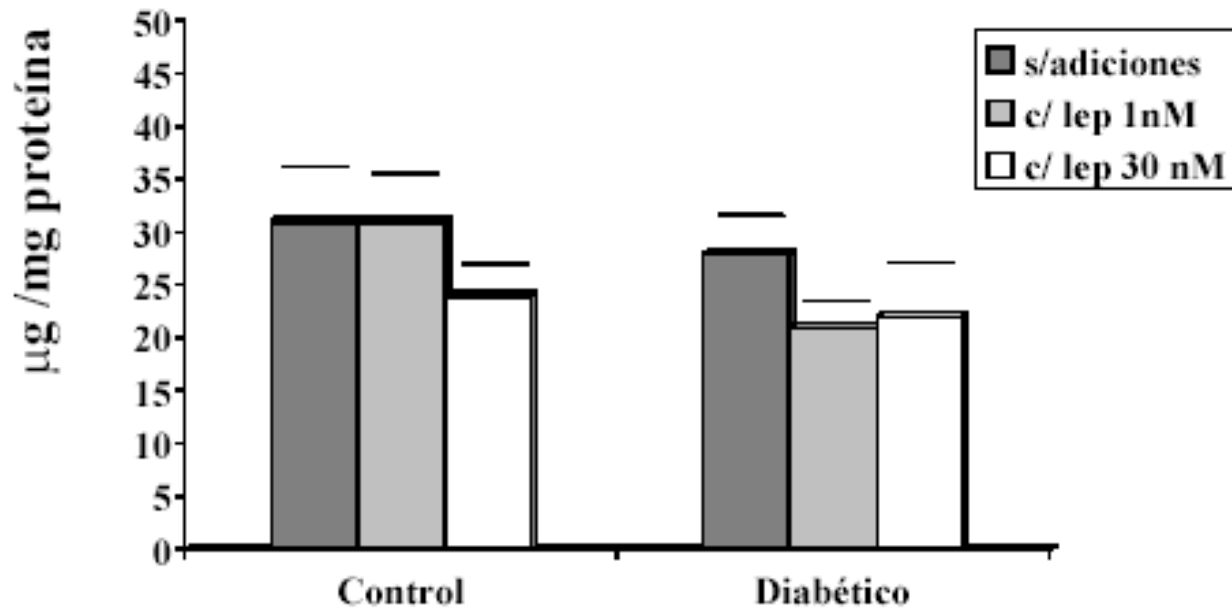
Figura 6: Niveles de Colesterol en embriones provenientes de rata sana. Efecto de leptina.



$p < 0.001$ vs diabético sin adiciones

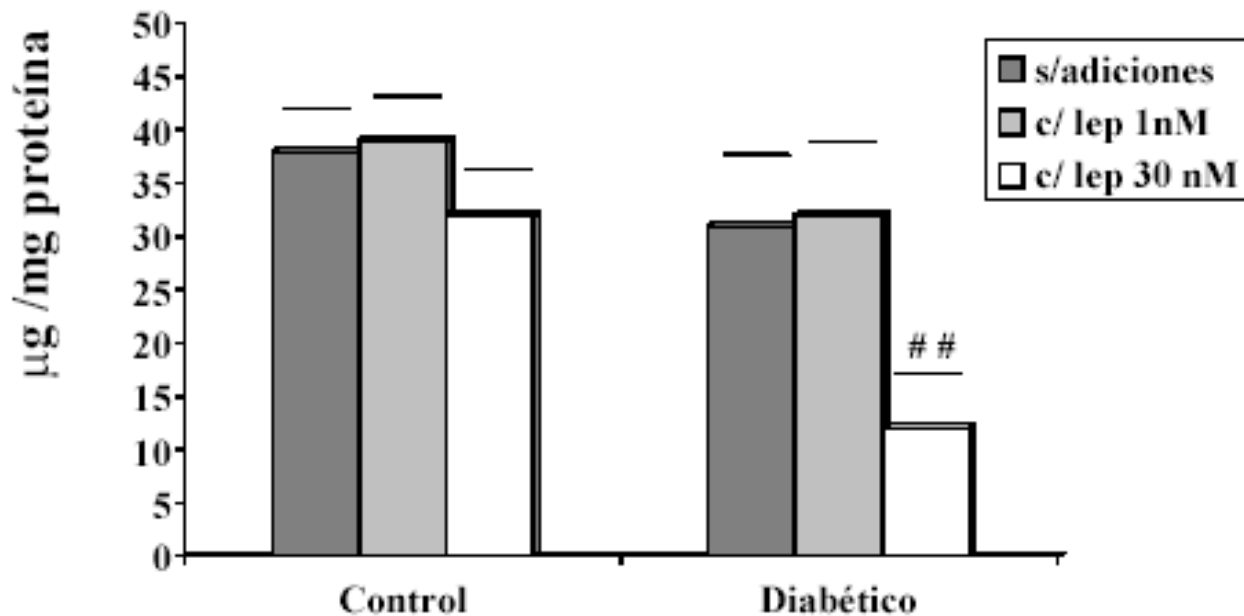
Los datos expresan el promedio \pm error estándar . En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de 7 embriones cada una, provenientes de animales diferentes (n=8) Test estadístico: ANOVA.

Figura 7: Niveles de Triglicéridos en embriones provenientes de rata sana y diabética. Efecto de leptina.



Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de 7 embriones cada una, provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

Figura 8: Niveles de Ésteres de Colesterol en embriones provenientes de rata sana y diabética. Efecto de leptina.



$p < 0.01$ vs. diabético sin adiciones

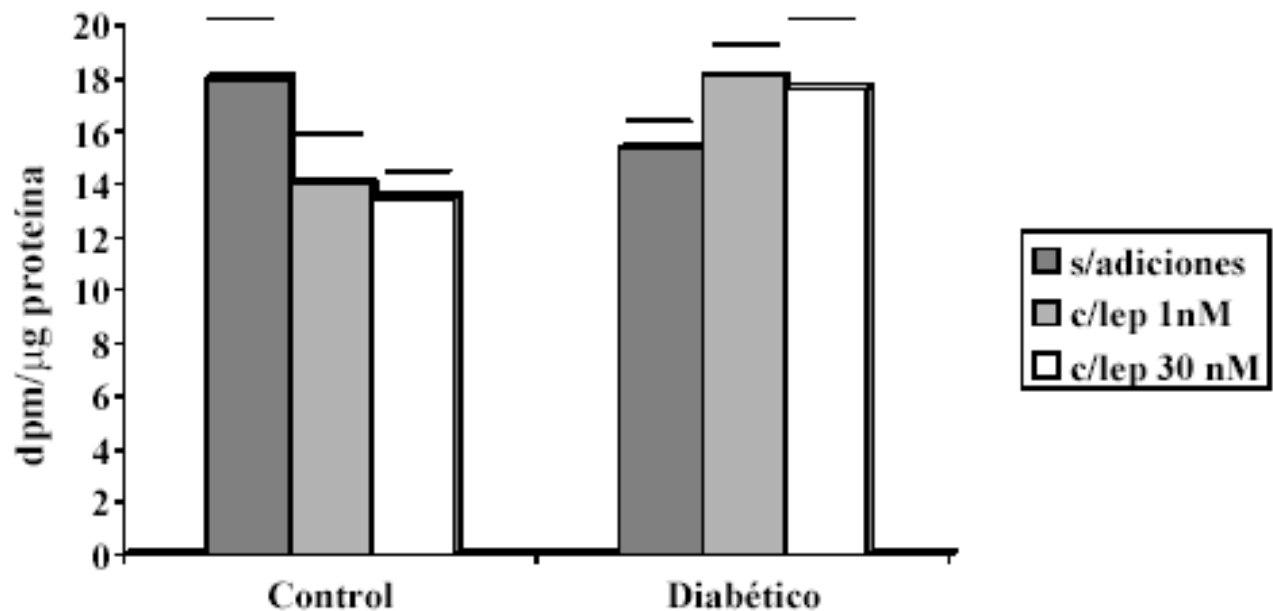
Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de 7 embriones cada una, provenientes de animales diferentes ($n=8$) Test estadístico: ANOVA.

Síntesis lipídica *de novo* en embriones de rata sana y diabética: Efecto de leptina

La incorporación de precursores radioactivos de la síntesis lipídica es una herramienta útil y extremadamente sensible para el estudio de la síntesis de lípidos a partir de un precursor determinado. El acetato es un compuesto que interviene en la síntesis lipídica desde los pasos iniciales, ya sea mediante la formación de ácidos grasos y posterior esterificación para formar triglicéridos y fosfolípidos o bien en la vía de síntesis del colesterol. Con el objetivo de dilucidar si la leptina modula la síntesis lipídica embrionaria, se incubaron los embriones en baño metabólico a 37° C en presencia de [14 C acetato] con y sin el agregado de leptina (1 y 30 nM). Posteriormente se realizó la extracción de los lípidos y evaluación de la radioactividad incorporada a cada especie lipídica. Como ya se mencionara, nuestros resultados previos muestran que los embriones de rata

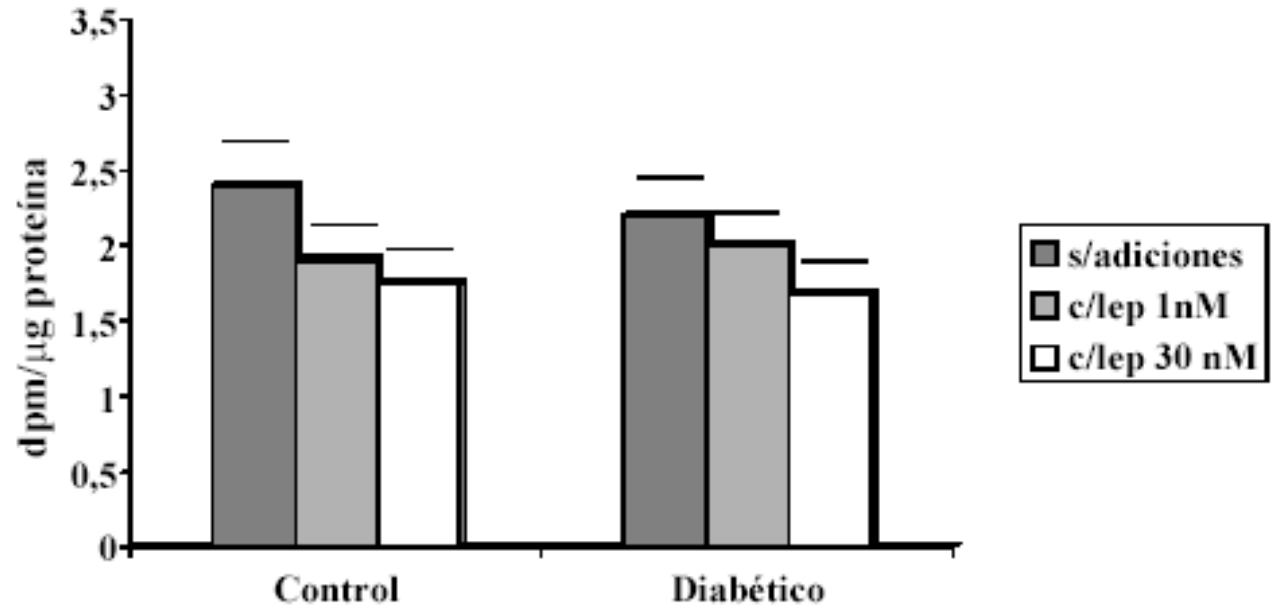
diabética presentan una disminución en la síntesis de triglicéridos y ésteres de colesterol a partir de acetato, (Jawerbaum y col 2002) resultados corroborados en el presente estudio (Figuras 12 y 13) ($p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente). El agregado de leptina exógena no modificó significativamente la incorporación de [14 C-acetato] a ésteres de colesterol, triglicéridos, colesterol o fosfolípidos en embriones de rata sana y diabética (Figuras 10 a 13).

Figura 9: Síntesis *de novo* de Fosfolípidos en embriones de rata sana y diabética. Efecto de leptina.



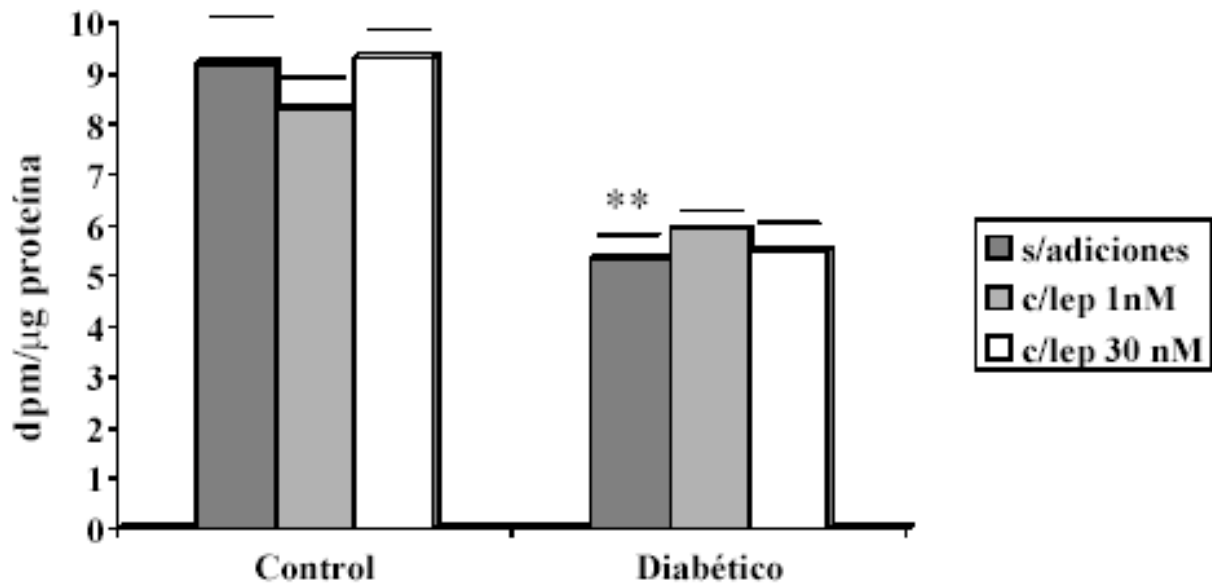
Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de 4 embriones cada una, provenientes de animales diferentes ($n=8$). Test estadístico: ANOVA.

Figura 10: Síntesis *de novo* de Colesterol en embriones de rata sana y diabética. Efecto de leptina.



Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de 4 embriones cada una, provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

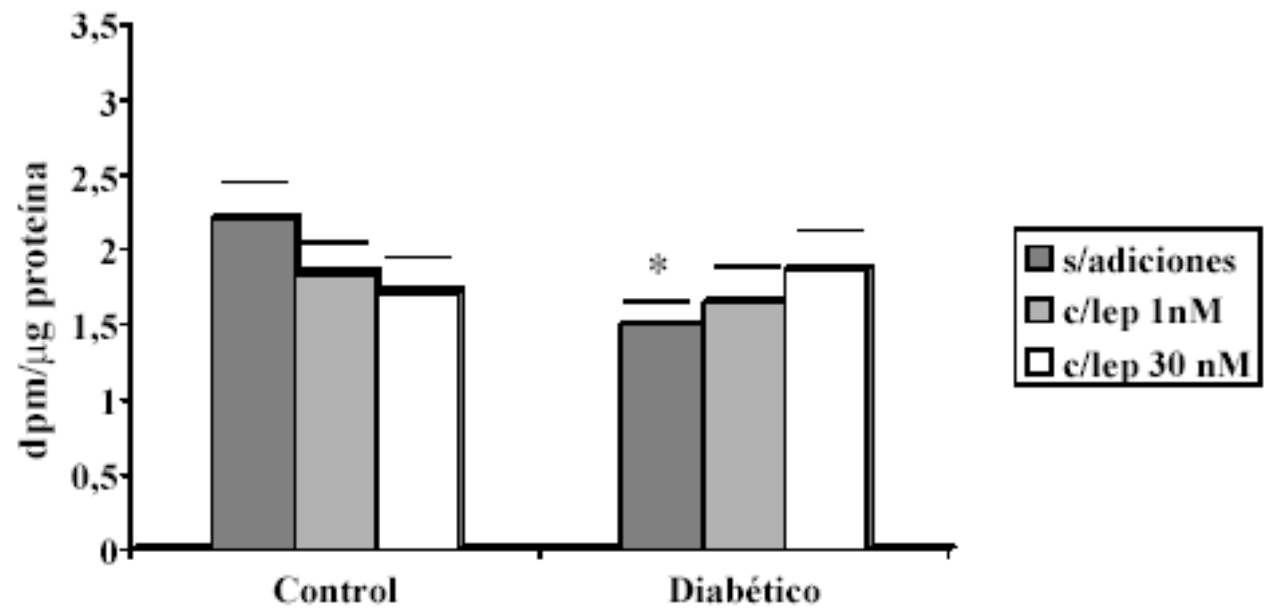
Figura 11: Síntesis *de novo* de Triglicéridos en embriones de rata sana y diabética. Efecto de leptina.



**p<0.01 vs. control sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de 4 embriones cada una, provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

Figura 12: Síntesis *de novo* de Ésteres de Colesterol en embriones de rata sana y diabética. Efecto de leptina.



* $p < 0.05$ vs. control sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de 4 embriones cada una, provenientes de animales diferentes ($n=8$). Test estadístico: ANOVA.

Metabolismo del óxido nítrico en el embrión de rata sana y diabética

El NO, cuya producción es catalizada por las tres isoformas de su enzima de síntesis (iNOS, eNOS y nNOS) es modulador de múltiples funciones incluyendo procesos de vasodilatación, inflamación y remodelación tisular, migración celular y supervivencia o muerte celular. De esta manera se destaca como importante morfógeno del embrión en desarrollo: su exceso o defecto puede causar alteraciones en el organismo en formación. (Lee y col 1994)

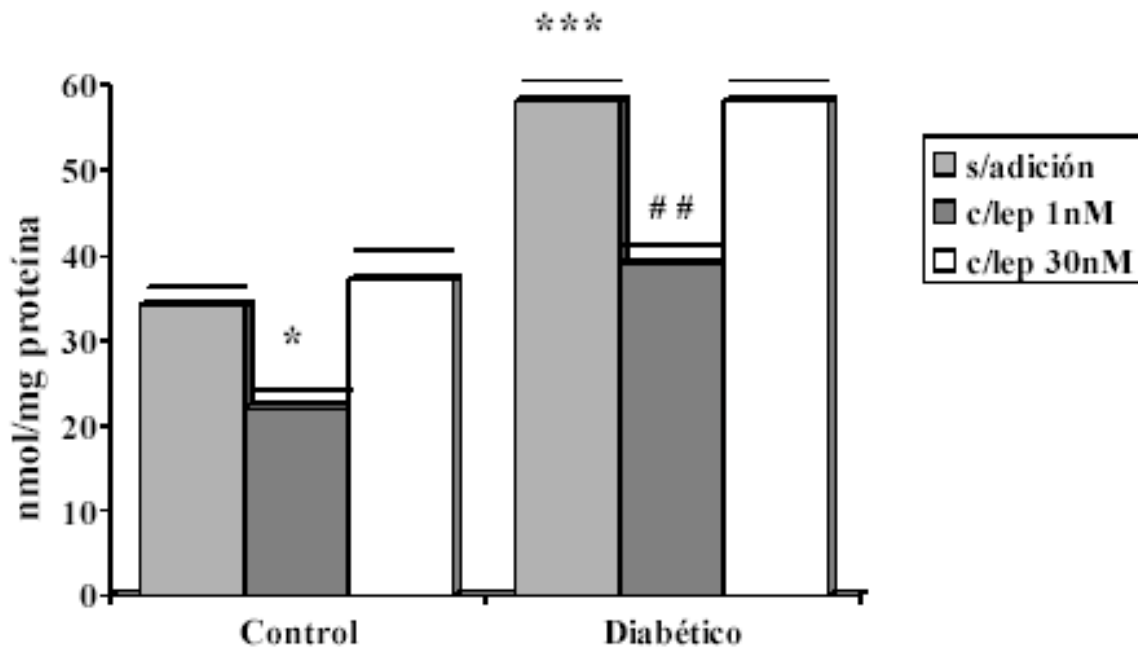
Producción de óxido nítrico en embriones de rata sana y diabética: Efecto de leptina

La vida media del NO es muy corta debido a su naturaleza reactiva, por esta razón se metaboliza rápidamente a compuestos más estables como los nitratos y nitritos.

Se ha descrito que la leptina modula la producción y liberación de NO en células de la granulosa y monocitos. (Huang y col 2005, Dixit y col 2003) En este trabajo se estudia la posibilidad de una modulación del contenido embrionario de NO por parte de esta hormona. Para ello se incubaron embriones de rata sana y diabética con y sin el agregado de leptina en dos concentraciones: 1 y 30 nM, en baño metabólico a 37 °C durante 3 hs, para luego evaluar el contenido de nitratos y nitritos, indicadores de la producción de NO, mediante la técnica de Griess.

Los resultados señalan un aumento en el contenido de nitratos y nitritos en los embriones diabéticos ($p < 0.001$) con respecto al control (Figura 13). El agregado de leptina a baja concentración provocó una disminución del contenido de estos metabolitos, siendo esta disminución más marcada en el caso de los embriones de rata diabética ($p < 0.01$). El agregado de leptina a mayor concentración no tuvo efecto sobre embriones de rata control o diabética (Figura 13).

Figura 13: Producción de NO en embriones de rata sana y diabética



* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. control sin adiciones

$p < 0.01$ vs. diabético sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de 4 embriones cada una, provenientes de animales diferentes ($n=8$). Test estadístico: ANOVA.

CAPITULO II: ALTERACIONES PLACENTARIAS INDUCIDAS POR LA DIABETES MATERNA: EFECTO DE LEPTINA

La placenta es un órgano cuyo origen, maduración e involución ocurren en el escaso período de tiempo que transcurre entre la implantación y el parto. Formada por la madre y el embrión en desarrollo, es de vital importancia para éste último: le provee nutrientes, agua, oxígeno y factores necesarios para su crecimiento, otorgando a su vez protección y sostén. La placenta se conforma en un proceso que implica invasión, migración, crecimiento, proliferación, apoptosis y fusión celular y en el que participan tejido materno y embrionario. Todos estos eventos están coordinados por medio de una complicada red de señales en las que participa el metabolismo materno, el cual se modifica sustancialmente durante la gesta. (Freinkel 1980, Herrera y col 1987, Leturque y col 1989)

Las alteraciones metabólicas que sufre el organismo de una madre diabética impactan negativamente en el desarrollo placentario, condicionando su estructura y función. (Eriksson y col 1984, Gewolb y col 1986, Shafrir y col 1991) En nuestro estudio observamos diferencias significativas en el peso de las placentas obtenidas, siendo este parámetro mayor en el caso de las ratas diabéticas con respecto a los animales sanos ($p < 0.01$), sin que esta anomalía se acompañe de diferencias en el peso de los neonatos (Tabla 5)

Tabla 5: Peso de la placenta y del neonato en la rata sana y diabética.

	Rata sana	Rata diabética
Peso placentario (mg peso húmedo)	559 ± 20	658 ± 30 **
Peso neonatal (mg peso húmedo)	3.38 ± 0.08	3.25 ± 0.17

Los datos expresan el promedio ± error estándar del peso de placentas y fetos provenientes de 8 ratas sanas y 8 ratas diabéticas. ** $p < 0.01$ comparado con el control. Test estadístico: t-student

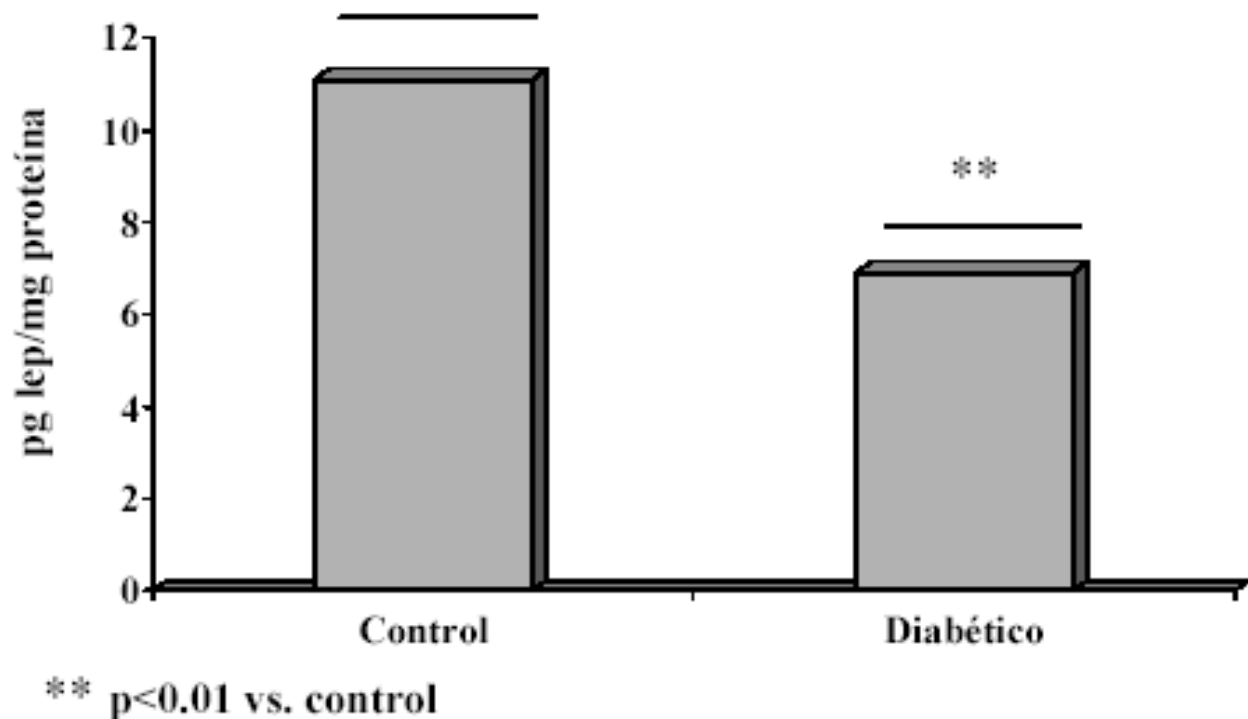
Niveles e inmunolocalización de leptina en la preñez a término de rata sana y diabética

Durante la preñez los niveles séricos de leptina aumentan sin que este incremento tenga una correspondencia con el aumento de la masa adiposa materna. Esta producción exacerbada se le atribuye a la placenta y se identificó a los trofoblastos como el tipo celular donde tiene lugar la mayor parte de su síntesis y liberación. (Amico y col 1998, Señarís y col 1997) Paralelamente se ha reportado que el receptor de leptina se expresa en tejido placentario. (Kawai y col 1999) Si bien la función de esta hormona durante la preñez no ha sido completamente dilucidada, se ha descrito un efecto modulador sobre la producción hormonal placentaria y sobre la actividad de las metaloproteasas, enzimas reguladoras de la invasividad trofoblástica. (Cameo y col 2003, Castellucci y col 2000) Las alteraciones en los niveles de insulina, la hiperglucemia y el aumento del estrés oxidativo en la diabetes materna condicionan la función placentaria. (White y col 2002) Asimismo, se ha descrito que la insulina, conocida inductora de la producción hormonal, es un regulador positivo de la síntesis de leptina en trofoblastos humanos en cultivo. (Coya y col 2001)

Niveles de leptina en tejido placentario

Habiéndose demostrado en el capítulo anterior que la diabetes por streptozotocina induce una disminución en los niveles séricos de leptina en el modelo de diabetes utilizado, en esta parte del trabajo se evaluó la producción de leptina placentaria en rata sana y diabética, observándose una disminución en sus niveles en el tejido de rata diabética con respecto al grupo control ($p < 0.01$) (Figura 14)

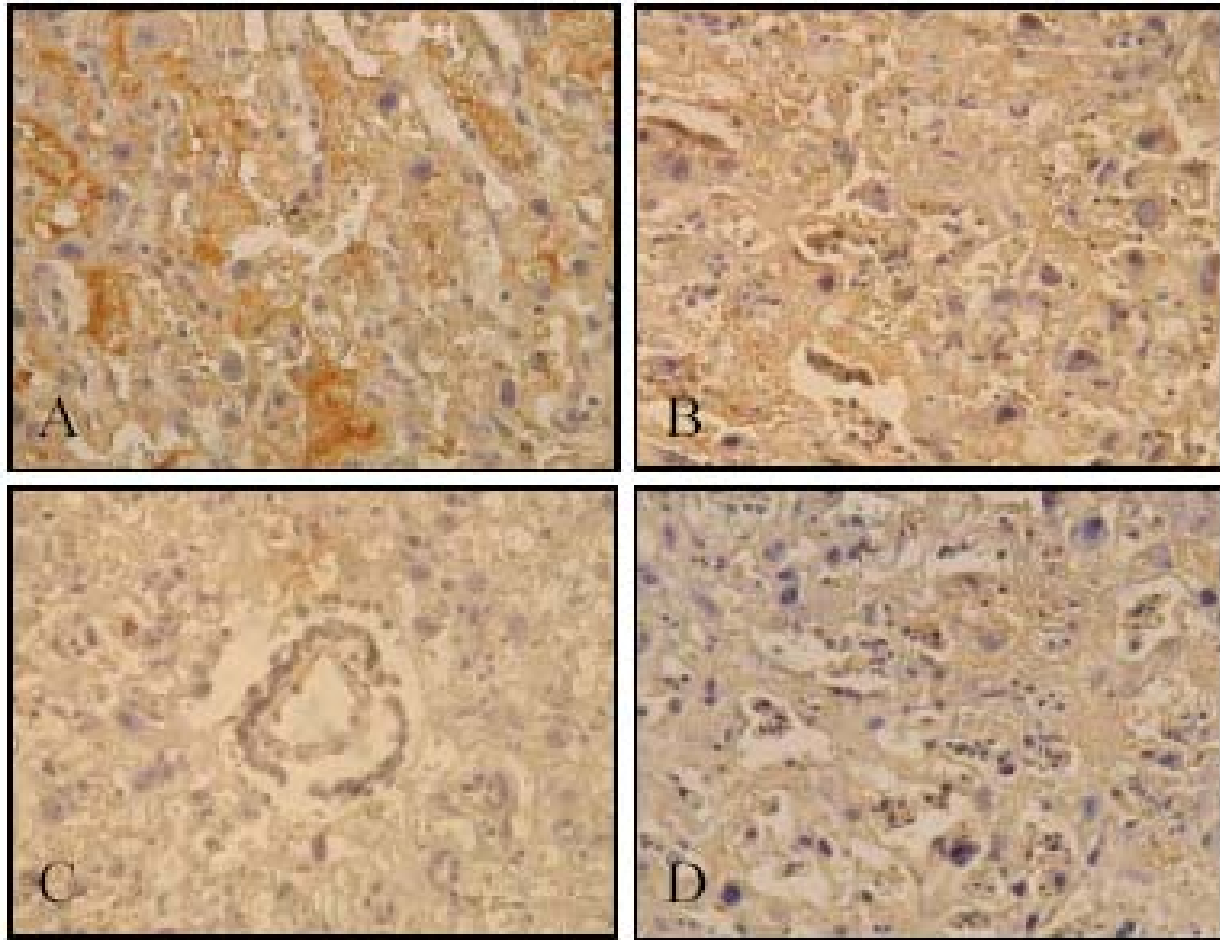
Figura 14: Niveles placentarios de leptina



Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: t-Student .

Inmunolocalización de leptina y su receptor en tejido placentario

En este estudio se evaluó la localización de la leptina placentaria mediante inmunohistoquímica. Se pudo comprobar que la leptina se localiza mayoritariamente en la zona del laberinto tanto en el tejido control como en el diabético. Se observó una menor intensidad de marca en el tejido diabético en relación al control. (Figura 15) (p<0.001)

Figura 15: Immunolocalización placentaria de leptina

Determinación de leptina por inmunohistoquímica en tejido placentario de rata control (A) y tejido placentario de rata diabética (B). (C) y (D) son los controles negativos respectivos realizados en ausencia de anticuerpo primario. Se destaca la menor marcación de leptina en la placenta de rata diabética en relación al control. Aumento 200X.

Tabla 6: Análisis densitométrico de leptina en cortes placentarios de rata sana y diabética.

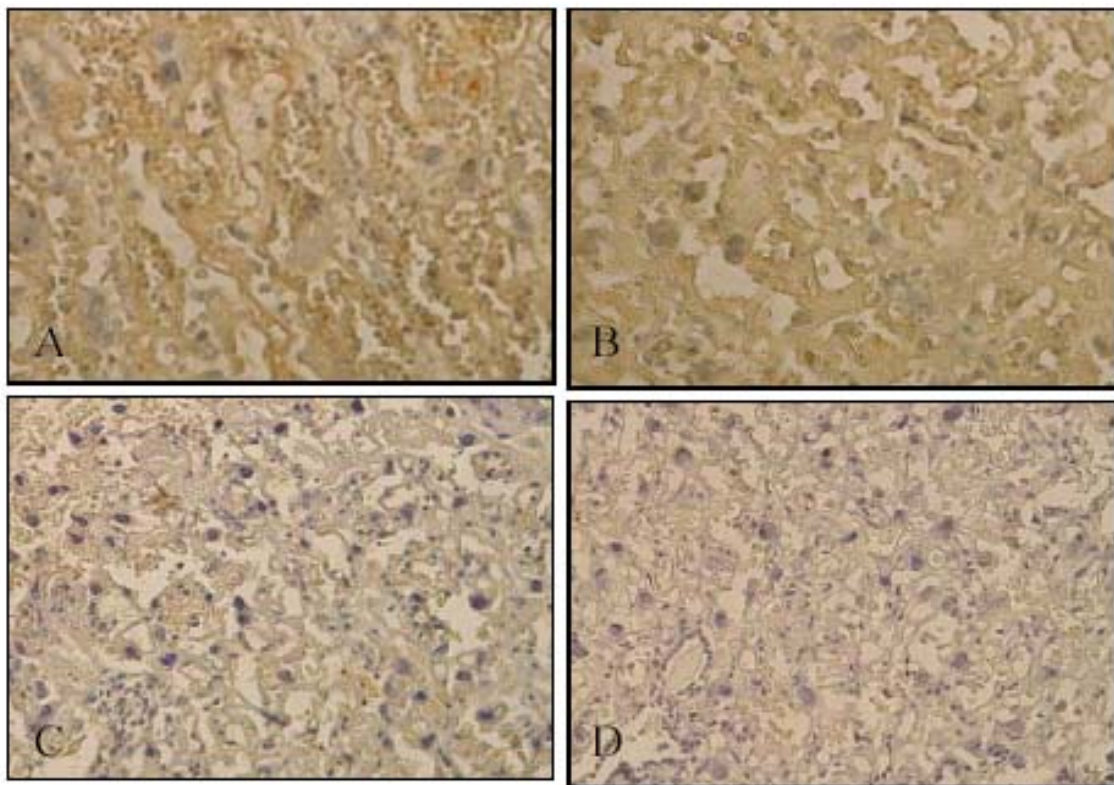
Control	Diabético
0.136 ± 0.004	0.087 ± 0.004 ***
n=6	n=6

Los datos expresan el promedio ± error estándar de los valores densitométricos obtenidos en 6 cortes placentarios de animales diferentes para cada grupo experimental. Se realizaron 10 mediciones por corte en un área de $7,3 \mu\text{m}^2$ *** $p < 0.001$ en relación al control. Test estadístico: t de Student.

Muchos estudios atribuyen la regulación de la acción de la leptina no sólo a su producción, sino también a la variación en la expresión de su receptor (Gavrilova y col 1997, Challier y col 2003). Por otra parte, la localización del mismo pone en evidencia el sitio de acción de la hormona. Por lo tanto, y con el objeto de estudiar los sitios de acción de la leptina se realizó un estudio de detección por inmunohistoquímica del receptor de leptina en cortes de tejido placentario de rata diabética y control (Figura 16).

Observamos que el receptor de leptina es de amplia distribución en la placenta: se observa tanto en la zona del laberinto como en la zona de unión. No se observaron diferencias en cuanto a la presencia o localización del receptor de leptina entre el tejido placentario proveniente de rata sana y diabética (Figura 16, Tabla 7).

Figura 16: Immunolocalización placentaria de receptor de leptina



Determinación de receptor de leptina por inmunohistoquímica en tejido placentario de rata control (A) y tejido placentario de rata diabética (B). (C) y (D) son los controles negativos respectivos realizados en ausencia de anticuerpo primario. Aumento 200X.

Tabla 7: Análisis densitométrico de receptor de leptina en cortes placentarios de rata sana y diabética.

Control	Diabético
0.079 ± 0.003	0.068 ± 0.003
n=6	n=6

Los datos expresan el promedio ± error estándar de los valores densitométricos obtenidos en 6 cortes placentarios de animales diferentes en cada grupo experimental. Se realizaron 10 mediciones por corte en un área de 7,3 μm^2 . Test estadístico: t de Student.

Efectos de leptina sobre el metabolismo lipídico en placenta a término de rata sana y diabética

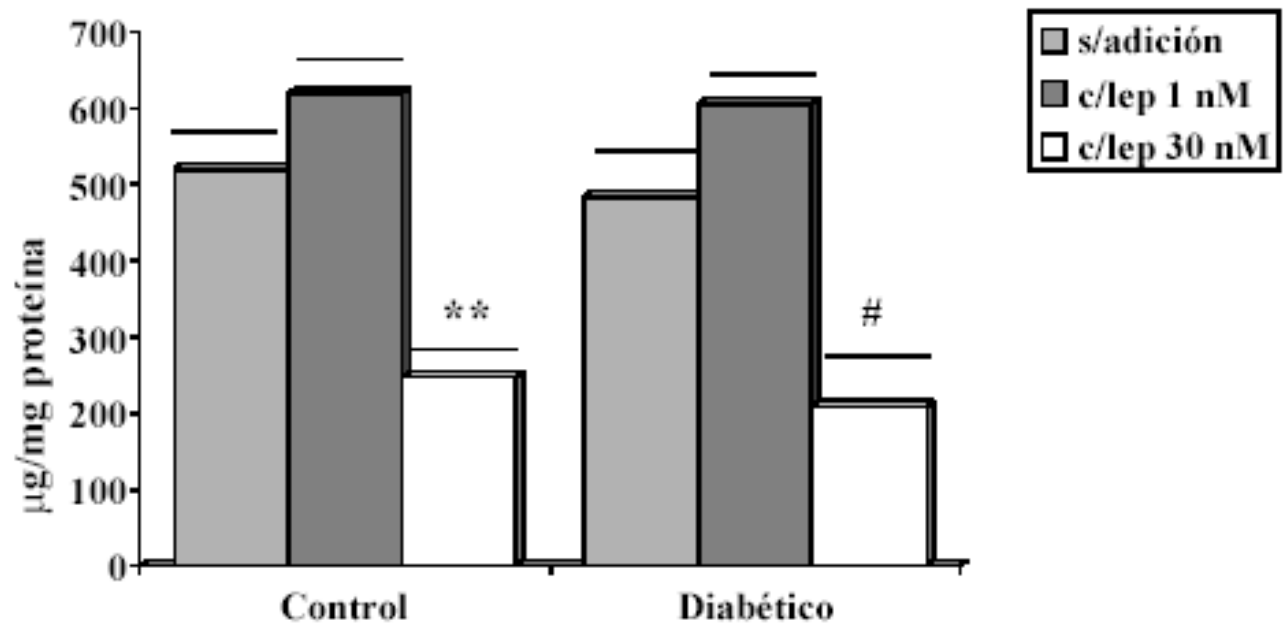
Los lípidos placentarios son precursores de síntesis hormonal, constituyentes de membranas plasmáticas y fuentes de energía dentro de la placenta, o bien para el feto en desarrollo al que pueden ser transferidos. Asimismo, están involucrados en las vías de señalización inter e intracelulares. La placenta de rata tiene capacidad de síntesis, almacenamiento y degradación lipídica, necesarios para la modulación de la transferencia de lípidos al feto en desarrollo (Diamant y col 1980, Diamant y col 1975a, Coleman y col 1984). Triglicéridos, ácidos grasos libres y fosfolípidos se hallan en la sangre materna unidos a proteínas transportadoras específicas, en la cara materna placentaria son desesterificados por lipasas específicas e incorporados como ácidos grasos libres sin modificaciones al interior de la célula placentaria. (Brandes y col 1987, Diamant y col. 1980) Allí son nuevamente esterificados a triglicéridos y fosfolípidos o incorporados como ácidos grasos libres en gotas lipídicas. (Hummel y col. 1976a, Shafrir y col 1987). Los lípidos séricos y los sintetizados *de novo* por la placenta son utilizados *in situ*, almacenados o en gran parte transferidos (lipólisis mediante) al feto en desarrollo (Hummel y col 1975). En el caso particular del colesterol y sus derivados, son utilizados como precursores de la síntesis de hormonas esteroideas placentarias o fetales. (Naoum y col 1987, Cummings y col 1982) La transferencia de lípidos al feto en desarrollo depende en gran parte de la concentración plasmática materna de las distintas especies lipídicas. (Diamant y col 1980) En la diabetes el metabolismo lipídico está alterado debido a la falta de insulina biodisponible, y la

concentración plasmática de lípidos se encuentra fuertemente incrementada, (Shafrir y col 1982) determinando un aumento del pasaje lipídico hacia el feto (Goldstein y col 1985) siendo ésta una de las causas propuestas para explicar el origen de la macrosomía inducida por la diabetes materna. Dada la importancia de la leptina como regulador del metabolismo lipídico en adipocitos, (Fruhbeck y col 2001b, Frühbeck y col 2002) intentamos dilucidar en este trabajo si la leptina placentaria modula el metabolismo lipídico en la placenta a término de rata sana y diabética. Con este objetivo se evaluó: a) los niveles de lípidos placentarios, b) la capacidad de síntesis lipídica placentaria y c) el catabolismo lipídico placentario.

Niveles de lípidos placentarios: efecto de leptina

El tejido placentario de rata sana y diabética a término fue incubado con y sin el agregado de leptina en dos concentraciones: 1 y 30 nM. Se extrajeron los lípidos y luego se separaron por cromatografía en capa delgada. No se observaron diferencias entre el tejido control y el diabético en cuanto al contenido de las cuatro especies lipídicas analizadas: fosfolípidos, colesterol, triglicéridos y ésteres de colesterol. Sin embargo se observó una importante reducción en el contenido lipídico en presencia de leptina, tanto en el tejido placentario proveniente de rata sana como de rata diabética. La menor concentración de leptina, sólo tuvo efecto sobre el contenido de ésteres de colesterol de placenta de rata diabética, reduciendo sus niveles en un 32 % respecto del tejido incubado sin adiciones ($p < 0.05$) (Figura 20). En la placenta control el agregado de leptina en una concentración 30 nM provocó una disminución de 48% en el contenido de fosfolípidos ($p < 0.01$), de 40% en el de colesterol ($p < 0.01$), de 62% en los triglicéridos ($p < 0.01$) y del 52% en los ésteres de colesterol ($p < 0.05$) (Figuras 17 a 20). En la placenta diabética, leptina 30 nM redujo en un 75% el contenido de fosfolípidos ($p < 0.05$), el de colesterol en un 50% ($p < 0.05$) y el de ésteres de colesterol en un 38% ($p < 0.05$) (Figuras 17 a 20).

Figura 17: Niveles de fosfolípidos en placenta a término de rata sana y diabética

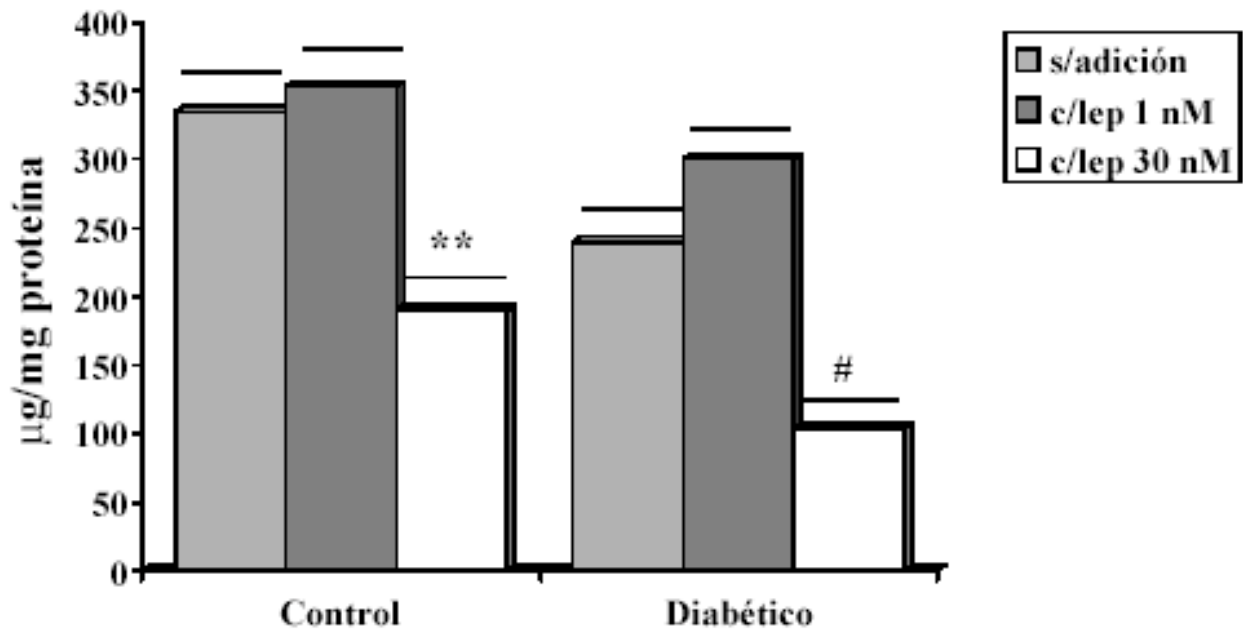


** $p < 0.01$ vs. control sin adiciones

$p < 0.05$ vs. diabético sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes ($n=8$). Test estadístico: ANOVA.

Figura 18: Niveles de colesterol en placenta a término de rata sana y diabética

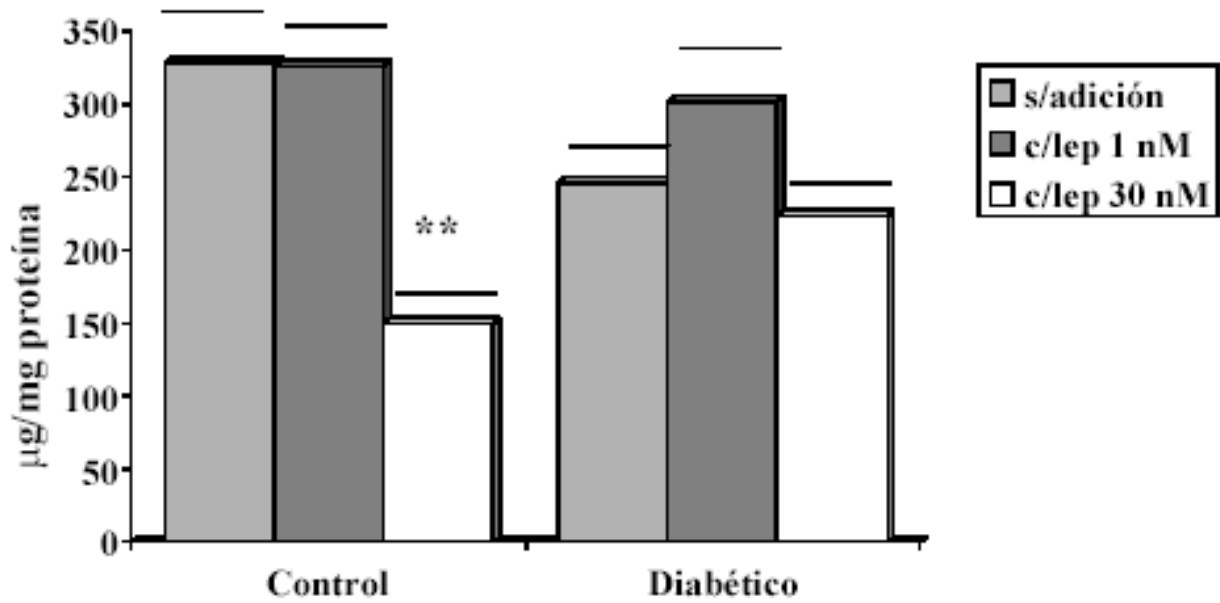


** $p < 0.01$ vs. control sin adiciones

$p < 0.05$ vs. diabético sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes ($n=8$). Test estadístico: ANOVA.

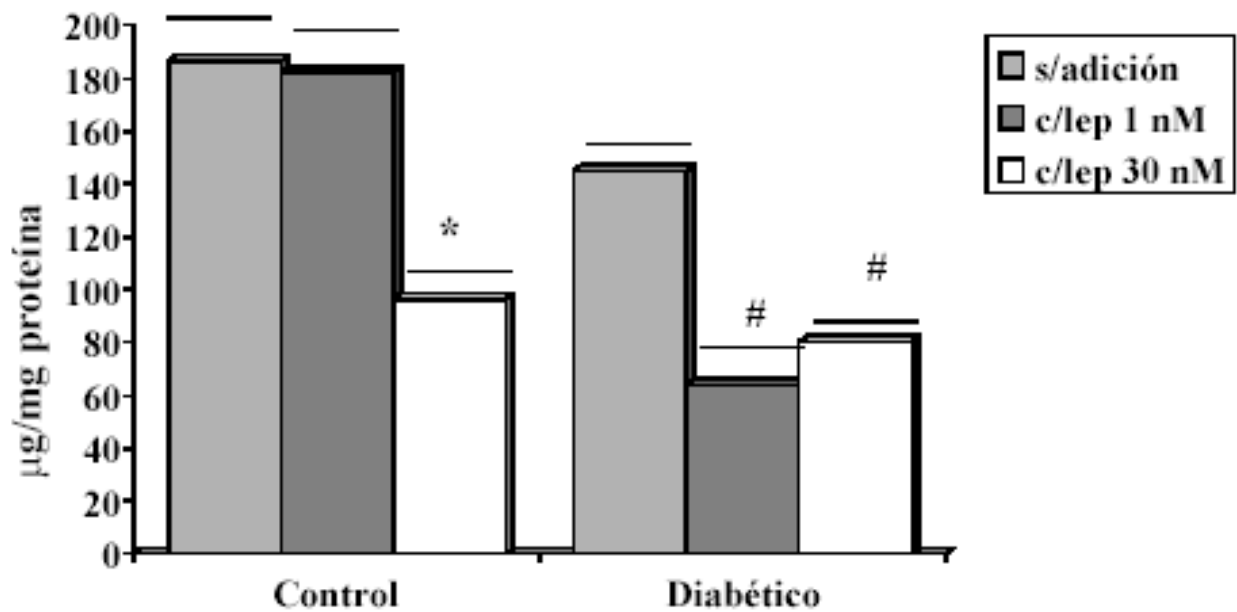
Figura 19: Niveles de triglicéridos en placenta a término de rata sana y diabética



** $p < 0.01$ vs. control sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes ($n=8$). Test estadístico: ANOVA.

Figura 20: Niveles de ésteres de colesterol en placenta a término de rata sana y diabética



* $p < 0.05$ vs. control sin adiciones

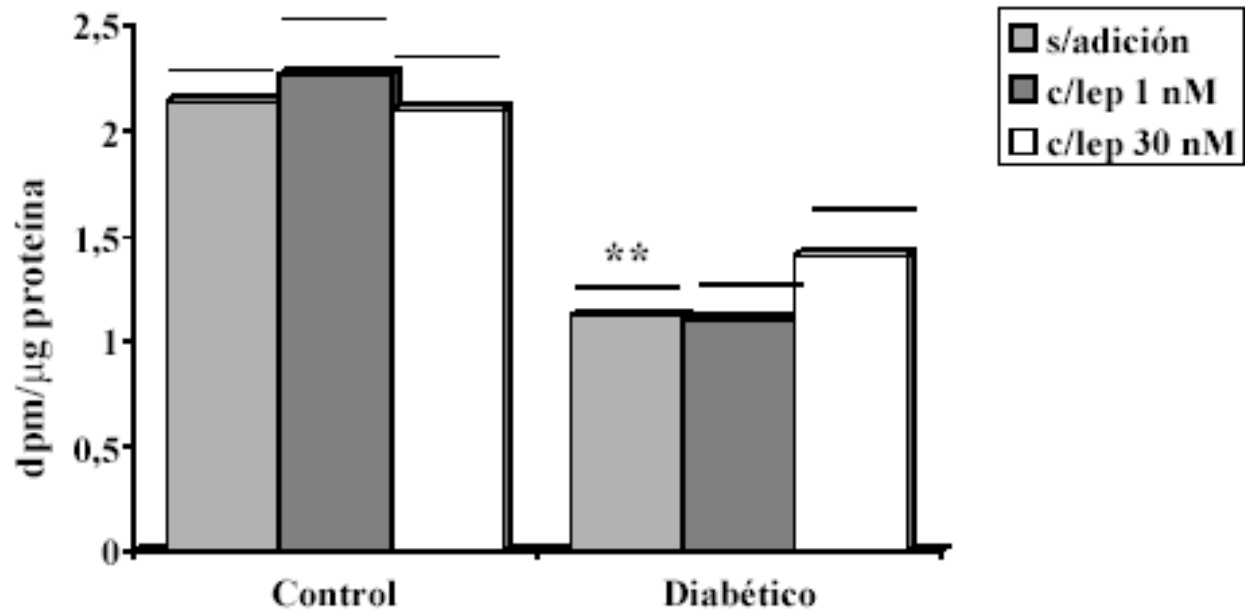
$p < 0.05$ vs. diabético sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes ($n=8$). Test estadístico: ANOVA.

Síntesis lipídica placentaria: Efecto de leptina

Teniendo en cuenta el importante efecto inhibitorio de leptina sobre los niveles de lípidos placentarios evidenciado por nuestros experimentos anteriores, se evaluó la eventual acción inhibitoria sobre la síntesis lipídica placentaria. La misma se estimó a partir de [^{14}C -acetato] como trazador en presencia o ausencia de leptina (1 y 30 nM). Observamos que el agregado de leptina exógena en baja o alta concentración no produjo ninguna variación en la síntesis de las especies lipídicas analizadas (Figuras 21 a 24). Al comparar la síntesis *de novo* en tejido control y diabético observamos en las Figuras 21 y 23 que el tejido diabético presenta una disminución de la síntesis de fosfolípidos de un 48 % ($p < 0.01$) y de un 59% de triglicéridos ($p < 0.001$) en relación al control.

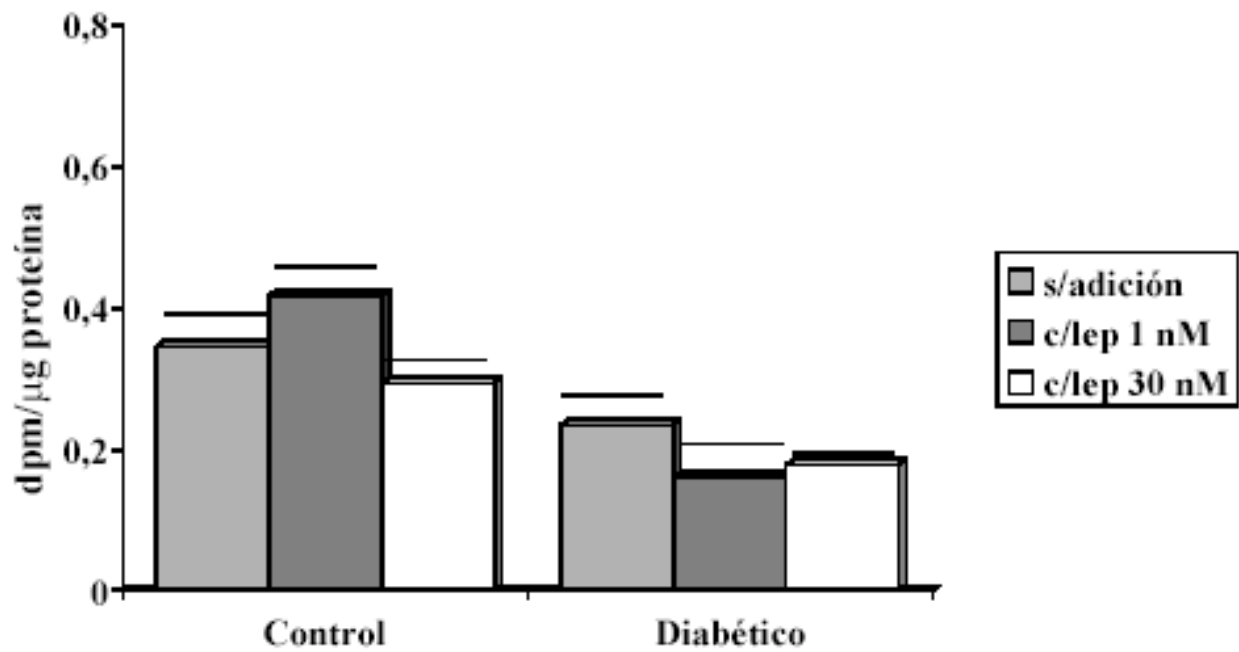
Figura 21: Síntesis *de novo* de fosfolípidos en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de leptina



** $p < 0.01$ vs. control sin adiciones

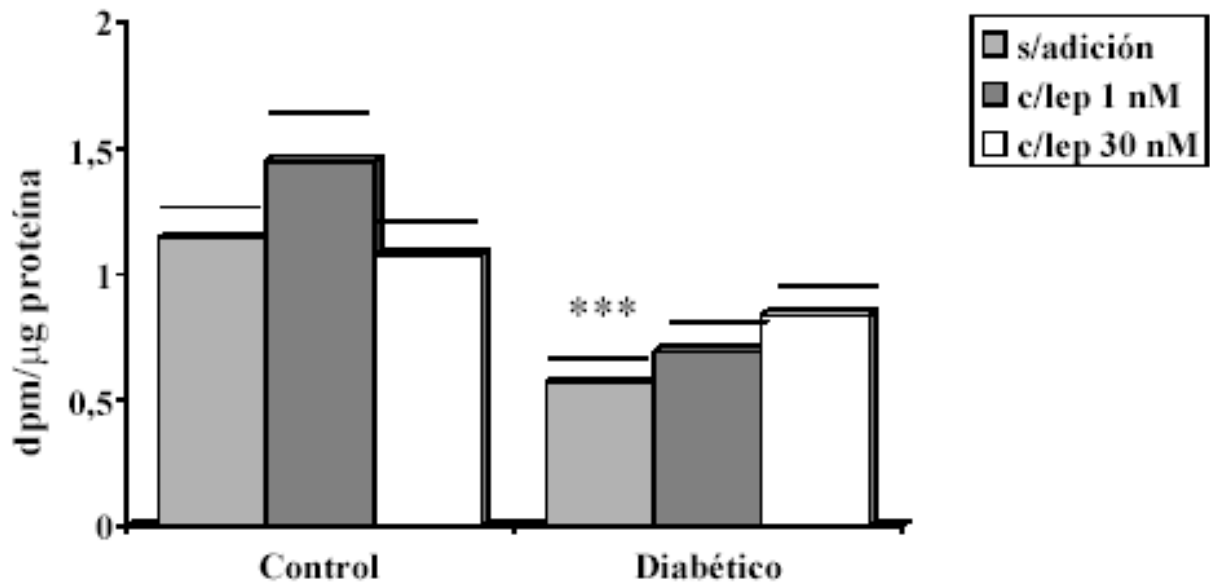
Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

Figura 22: Síntesis *de novo* de colesterol en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de leptina



Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

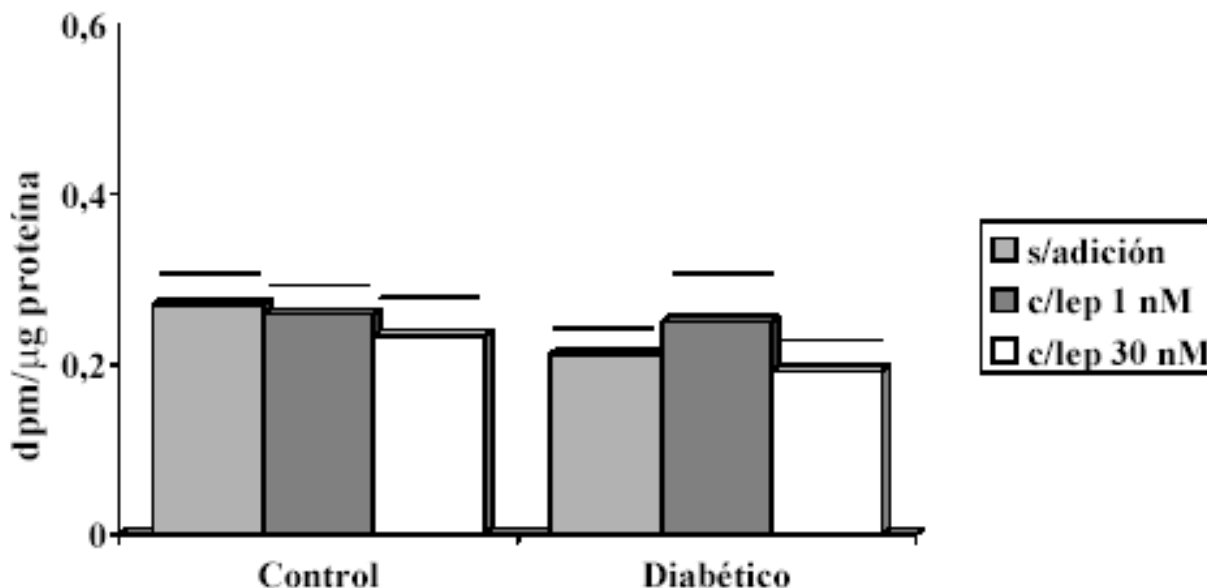
Figura 23: Síntesis *de novo* de triglicéridos en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de leptina



*** $p < 0.001$ vs. control sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes ($n=8$). Test estadístico: ANOVA.

Figura 24: Síntesis *de novo* de ésteres de colesterol en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de leptina

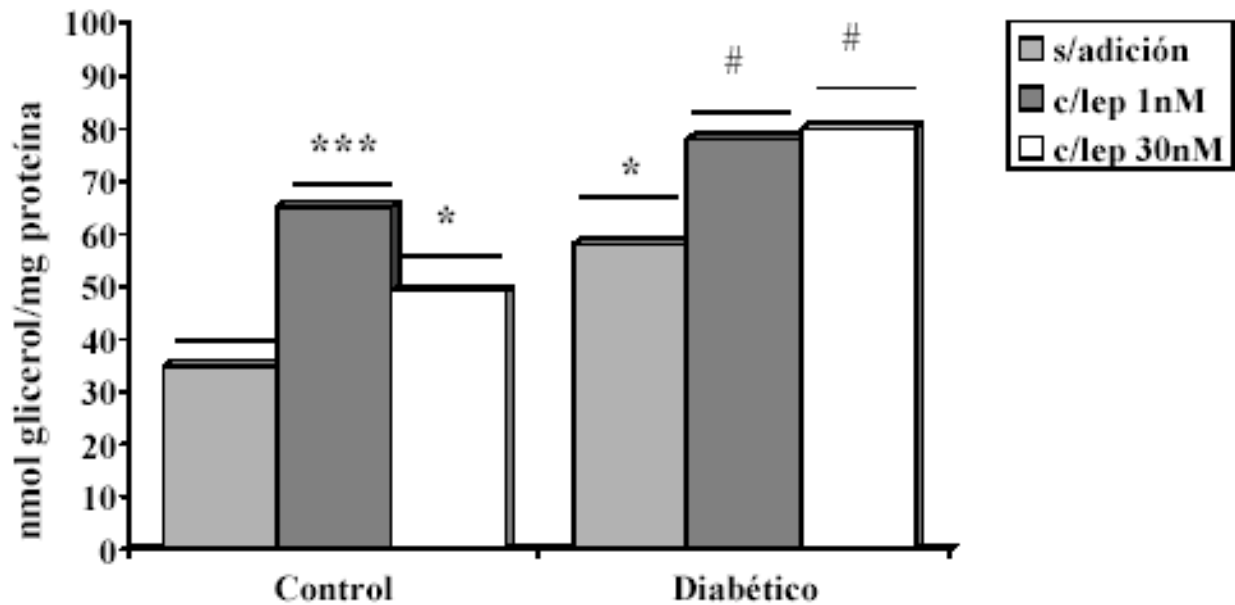


Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

Catabolismo lipídico placentario: efecto de leptina

El índice de catabolismo lipídico placentario producido por la presencia de leptina, fue estimado evaluando la producción de glicerol liberado al medio de incubación por dicho tejido proveniente de rata sana y diabética, en baño metabólico en presencia o ausencia de dos concentraciones de leptina (1 y 30 nM). En la Figura 25 se observa que el tejido placentario de rata diabética presenta un aumento en la actividad catabólica con respecto al tejido control ($p < 0.05$). El agregado de leptina 1 y 30 nM provoca un aumento en el catabolismo de lípidos placentarios en el tejido control ($p < 0.001$ y $p < 0.05$ respectivamente) al igual que en el tejido diabético ($p < 0.05$ y $p < 0.05$ respectivamente).

Figura 25: Catabolismo lipídico en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de leptina



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

$p < 0.05$ vs. diabético sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes ($n=8$). Test estadístico: ANOVA.

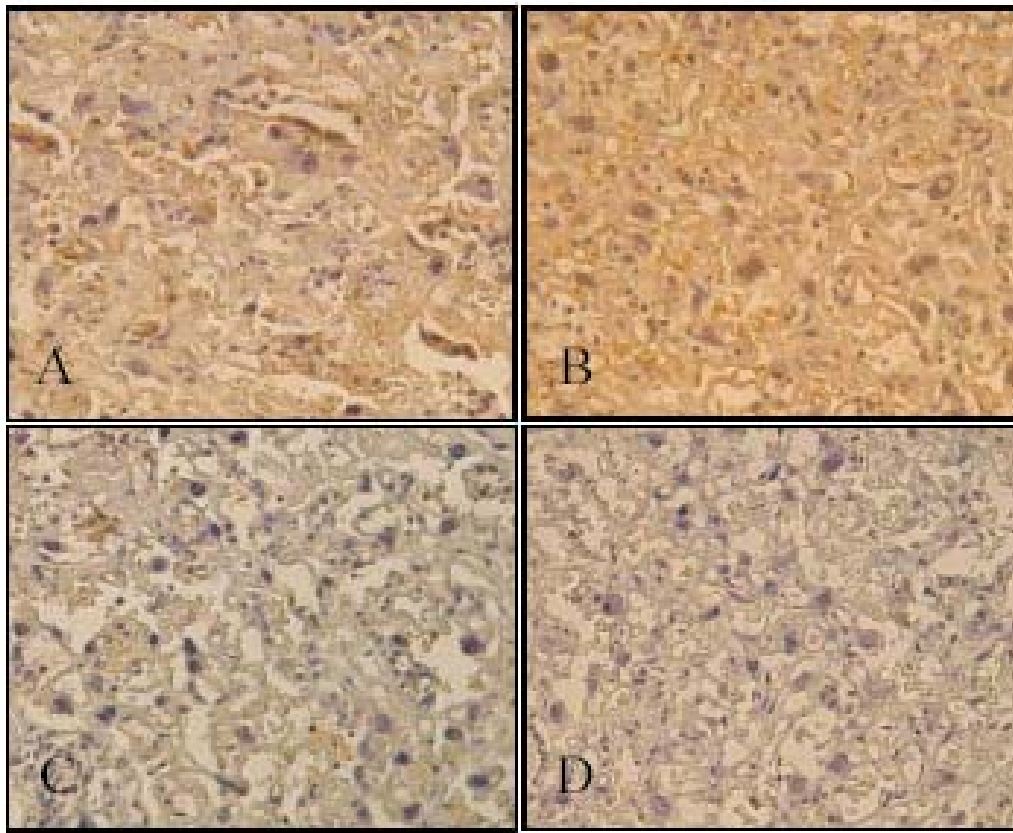
Efecto de leptina sobre el metabolismo de óxido nítrico en placenta a término de rata sana y diabética

El NO actúa en múltiples procesos fisiológicos, siendo un importante regulador de la angiogénesis y el tono vascular y, por lo tanto, del flujo sanguíneo. (Moncada y col 1991) En diferentes tejidos diabéticos la producción de óxido nítrico se encuentra afectada observándose tanto disminución del NO biodisponible, como incremento en la producción de NO principalmente dependiente de la inducción de la isoenzima iNOS. (Moncada y col 1991) Altos niveles de NO combinados con un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno inducida por la diabetes da lugar a la formación de peroxinitritos, potentes oxidantes y causantes de daño celular por nitrosilación de proteínas, ADN y lípidos. (Szabó 2003)

La producción de NO placentaria cobra especial relevancia, ya que el feto en desarrollo depende del transporte a través de la placenta para la transferencia bidireccional de nutrientes y oxígeno. Como ya se mencionó, la placenta de madre diabética presenta numerosas alteraciones estructurales y funcionales, que podrían ser causadas en parte por una alteración en el metabolismo nitridérgico. Con estos antecedentes se estudió por método inmunohistoquímico la expresión de las isoformas endotelial e inducible de la NOS en tejido placentario a término de rata sana y diabética

Immunolocalización placentaria de iNOS y eNOS

Al evaluar la inmunolocalización de la isoforma endotelial de la NOS en la placenta de rata a término, observamos una mayor intensidad de dicha marcación en el tejido diabético en relación al control ($p < 0.001$) (Figura 26, Tabla 8). En forma semejante observamos que la marcación de iNOS presenta una mayor intensidad en tejido diabético en relación al control ($p < 0.001$) (Figura 27, Tabla 9). Las dos isoenzimas se localizan preferentemente en la zona del laberinto.

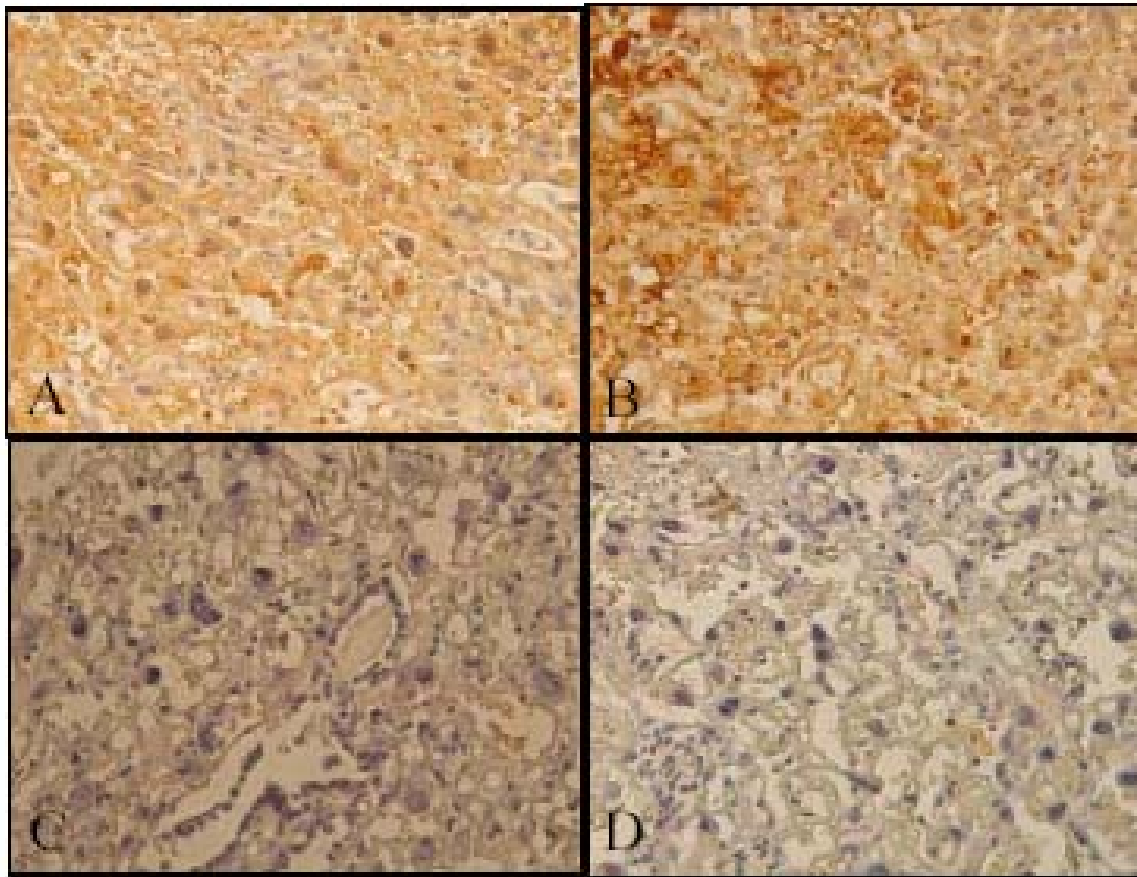
Figura 26: Immunolocalización placentaria de eNOS

Determinación de eNOS por inmunohistoquímica en tejido placentario de rata control (A) y tejido placentario de rata diabética (B). (C) y (D) son los controles negativos respectivos realizados en ausencia de anticuerpo primario. Se destaca la mayor marcación de eNOS en la placenta de rata diabética en relación al control. Aumento 200X.

Tabla 8: Análisis densitométrico de eNOS en cortes placentarios de rata sana y diabética.

Control	Diabético
0.082 ± 0.004	0.148 ± 0.004 ***
n=6	n=6

Los datos expresan el promedio ± error estándar de los valores densitométricos obtenidos en 6 cortes placentarios de animales diferentes en cada grupo experimental. Se realizaron 10 mediciones por corte en un área de 7,3 μm^2 *** $p < 0.001$ en relación al control. Test estadístico: t de Student.

Figura 27: Inmunolocalización placentaria de iNOS

Determinación de iNOS por inmunohistoquímica en tejido placentario de rata control (A) y tejido placentario de rata diabética (B). (C) y (D) son los controles negativos respectivos realizados en ausencia de anticuerpo primario. Se destaca la mayor marcación de iNOS en la placenta de rata diabética en relación al control. Aumento 200X

Tabla 9: Análisis densitométrico de iNOS en cortes placentarios de rata sana y diabética.

Control	Diabético
0.099 ± 0.004	0.209 ± 0.005***
n=6	n=6

Los datos expresan el promedio ± error estándar de los valores densitométricos obtenidos en 6 cortes placentarios de animales diferentes en cada grupo experimental. Se realizaron 10 mediciones por corte en un área de $7,3 \mu\text{m}^2$ *** $p < 0.001$ en relación al control. Test estadístico: t de Student.

Producción de NO placentaria: Efecto de leptina

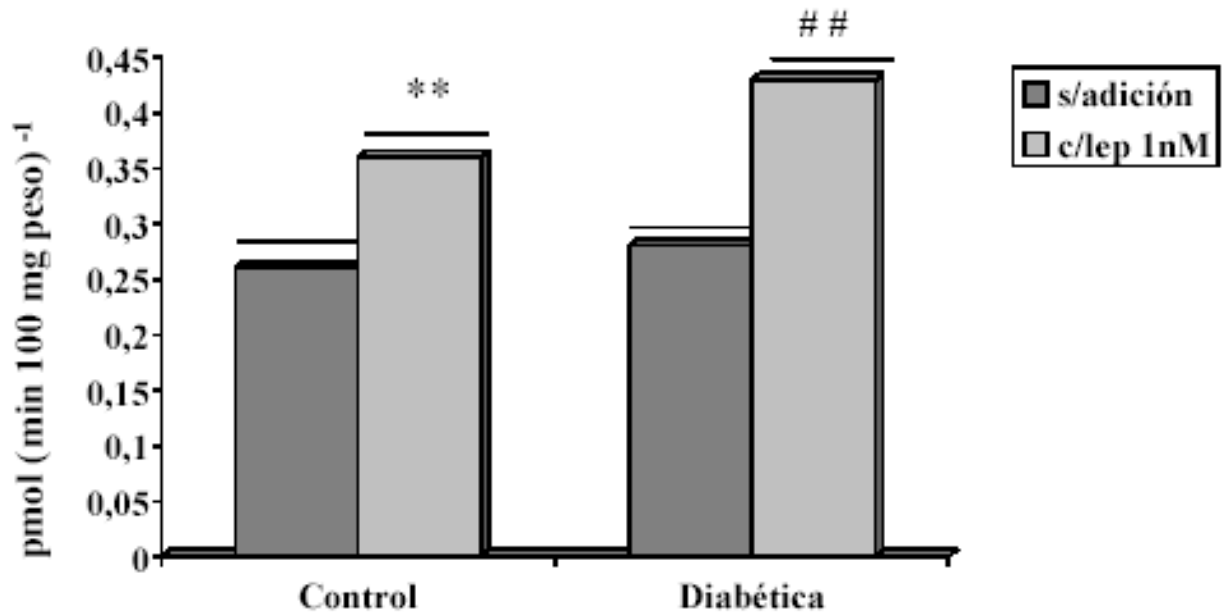
Se analizó la producción de NO evaluando la actividad NOS y la producción de nitratos y nitritos, metabolitos estables del NO. La actividad óxido nítrico sintasa se cuantificó evaluando la radioconversión de [¹⁴C]-arginina a [¹⁴C]-citrulina, y la producción de nitratos y nitritos, por el método de Griess, en el tejido placentario de rata sana y diabética. En la Figura 28 observamos que no hay diferencias en la actividad NOS entre el tejido sano y el diabético. Tampoco se hallaron diferencias en cuanto al contenido de nitratos y nitritos entre ambos grupos (Figura 29).

Como ya se ha mencionado, existen ejemplos de modulación de la producción de NO por leptina en otros tejidos. (Huang y col 2005, Dixit y col 2003) Se evaluó en este estudio si adiciones de leptina modulan la producción placentaria de NO.

En la Figura 28 se observa que el agregado de leptina 1 nM al medio de incubación incrementa significativamente la actividad de la NOS tanto en el tejido control (28%) ($p < 0.001$) como en el grupo diabético (35%) ($p < 0.001$).

La Figura 29 ilustra sobre la capacidad moduladora de leptina sobre la producción de NO. Leptina 1 nM incrementa en un 40% los niveles de NO placentarios en ratas sanas ($p < 0.01$), y en un 57% en las diabéticas ($p < 0.01$). No se observa dicha modulación a mayor concentración de leptina.

Figura 28: Actividad óxido nítrico sintasa en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de NO

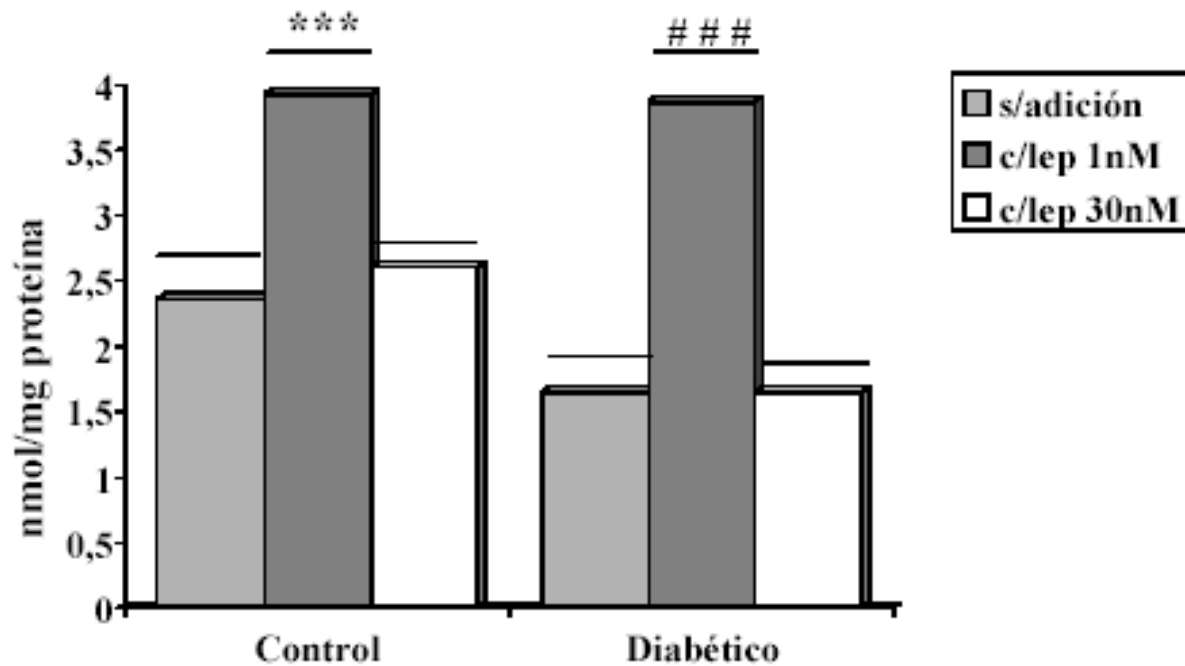


****p<0.01 vs. control sin adiciones**

p<0.01 vs. diabético sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

Figura 29: Niveles de nitratos y nitritos de placenta a término de rata sana y diabética



*** $p < 0.001$ vs. control sin adiciones

$p < 0.001$ vs. diabético sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes ($n=8$). Test estadístico: ANOVA.

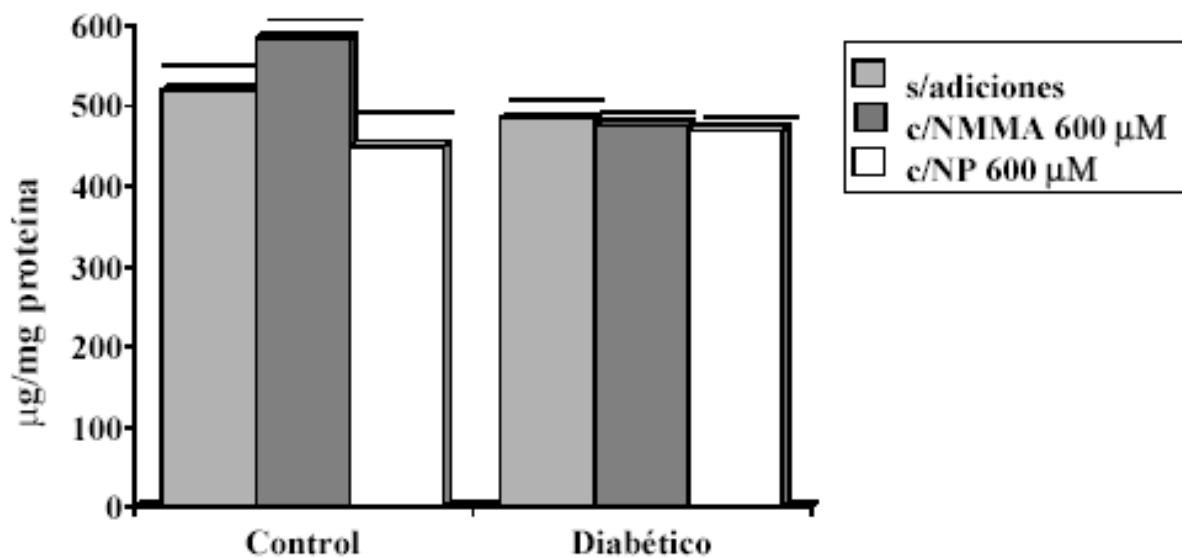
Efecto de NO sobre el metabolismo lipídico placentario

Como ya se ha mencionado, hay autores que demuestran que el NO es el mediador de algunas acciones de la leptina, incluyendo a aquellas relacionadas con la regulación del metabolismo lipídico en adipocitos. (Frühbeck y col 2001b) Dados los efectos de leptina sobre el metabolismo lipídico y sobre la producción de NO, se evaluó la capacidad de NO de regular el metabolismo lipídico placentario. Con este objetivo se incubó tejido placentario a término de rata sana y diabética en presencia o ausencia de dadores de NO y de inhibidores de NOS, para luego evaluar los parámetros inherentes al metabolismo lipídico.

Niveles de lípidos en placenta de rata sana y diabética: Efecto de NO

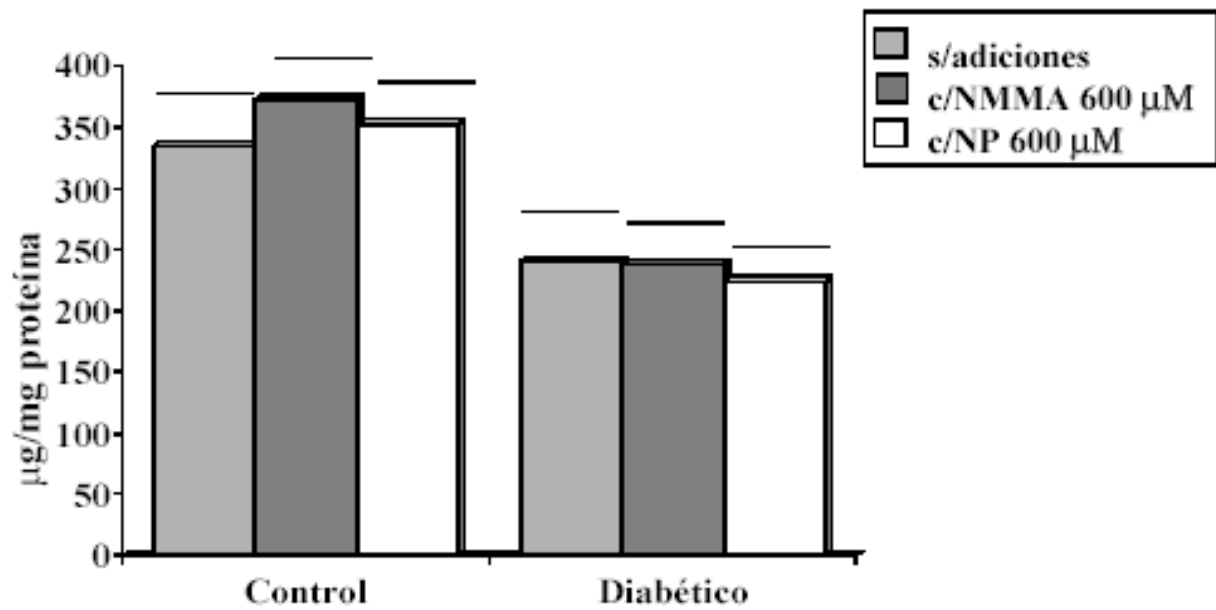
El tejido placentario de rata sana y diabética a término fue incubado en presencia o ausencia de NMMA 600 μ M, inhibidor de la NOS, y de NP 600 μ M dador de NO. Se extrajeron los lípidos y luego se desarrollaron por cromatografía en capa delgada. En las Figuras 30 a 33 se puede observar que no hay efecto de NMMA o de NP sobre la masa total de las especies lipídicas analizadas: fosfolípidos (Figura 30), colesterol, (Figura 31), triglicéridos (Figura 32), y ésteres de colesterol (Figura 33), en tejido placentario de rata sana o diabética.

Figura 30: Niveles de fosfolípidos en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de NO



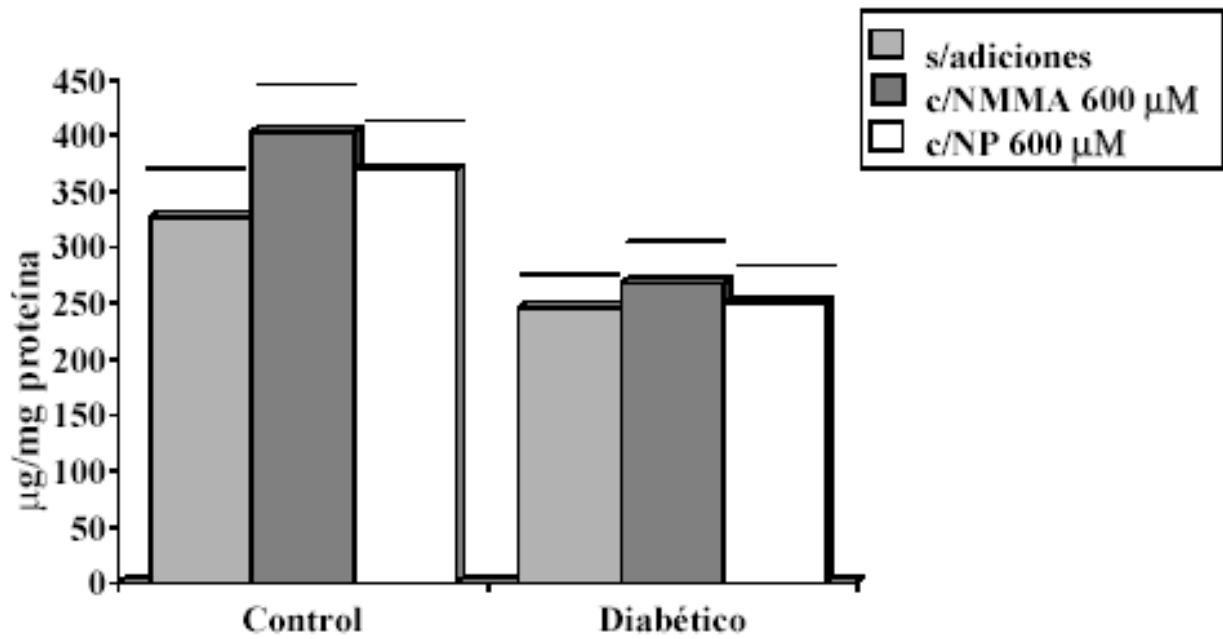
Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

Figura 31: Niveles de colesterol en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de NO



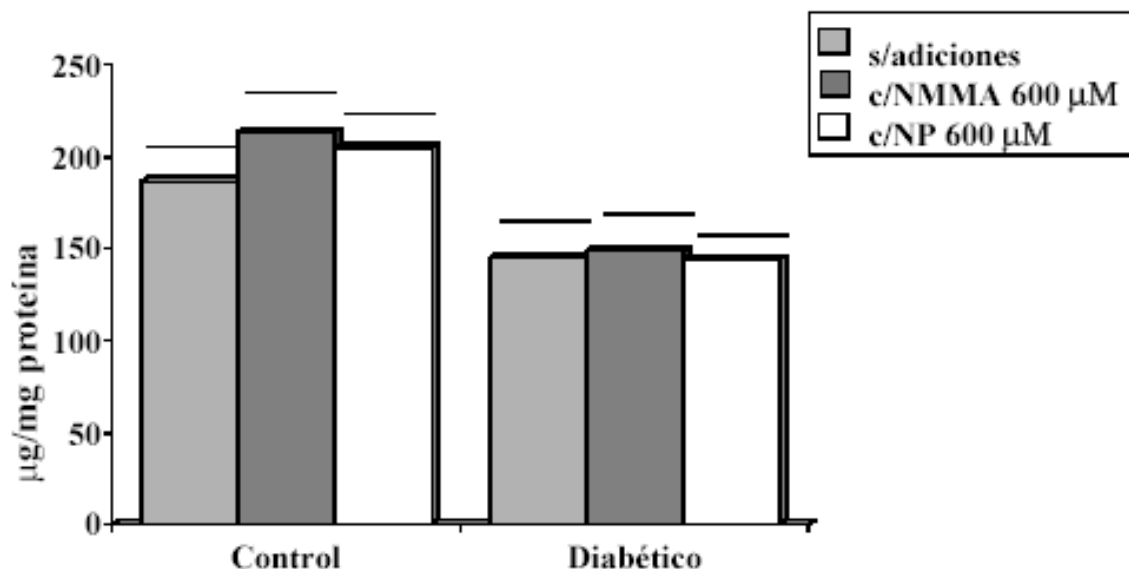
Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes ($n=8$). Test estadístico: ANOVA.

Figura 32: Niveles de triglicéridos en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de NO



Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

Figura 33: Niveles de ésteres de colesterol en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de NO



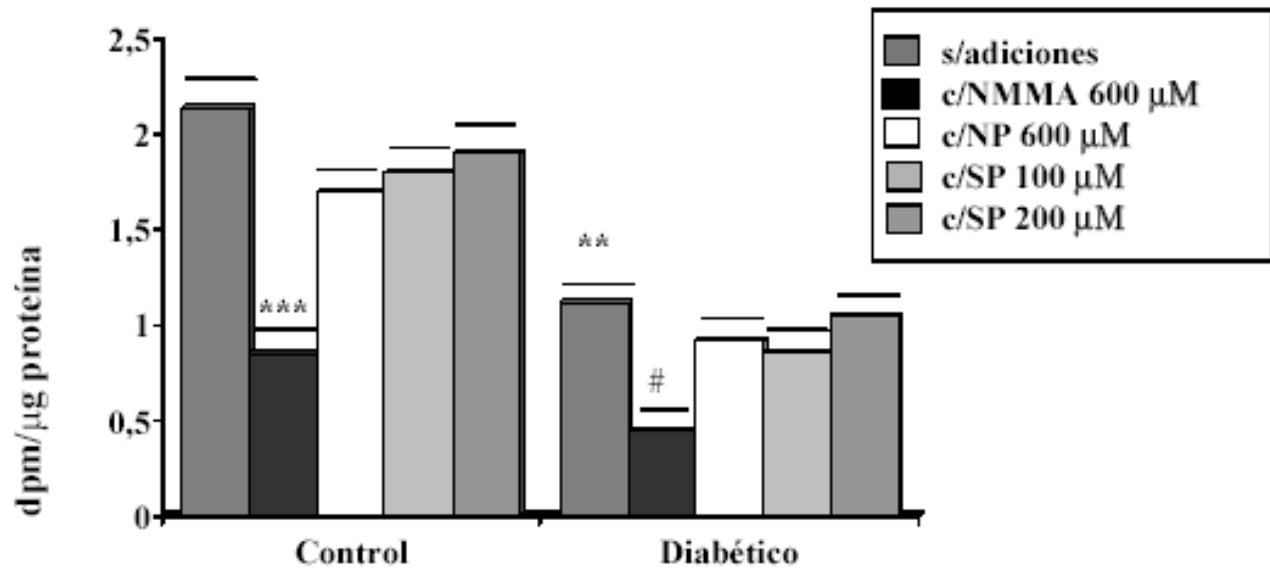
Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

Síntesis lipídica *de novo* en placenta de rata sana y diabética: Efecto de NO

Se evaluó la síntesis lipídica mediante la incorporación de [14 C- acetato] a las distintas especies de lípidos. Con el objetivo de estudiar la participación del NO en el proceso se utilizaron NP 600 μ M y SP 100 y 200 μ M como generadores de NO en el medio de incubación, y NMMA 600 μ M como inhibidor de la NOS.

Se observa el efecto inhibitorio del NMMA sobre la síntesis lipídica placentaria a partir de [14 C] acetato (Figuras 34 a 37). NMMA 600 μ M provoca una importante disminución (75% y 65%) en la síntesis de fosfolípidos en la placenta control ($p < 0.001$) y diabética ($p < 0.05$) respectivamente (Figura 34), una disminución del 98% en la síntesis de triglicéridos en la placenta control ($p < 0.001$), y del 47% en la diabética ($p < 0.001$) (Figura 36) y una disminución del 63% en la síntesis de ésteres de colesterol en la placenta control ($p < 0.01$) y del 75% en la diabética ($p < 0.001$) (Figura 37). Los generadores de NO evaluados no modifican la síntesis lipídica *de novo* en ninguna de las especies analizadas en placentas sanas o diabéticas (Figuras 34 a 37).

Figura 34: Síntesis *de novo* de fosfolípidos en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de NO

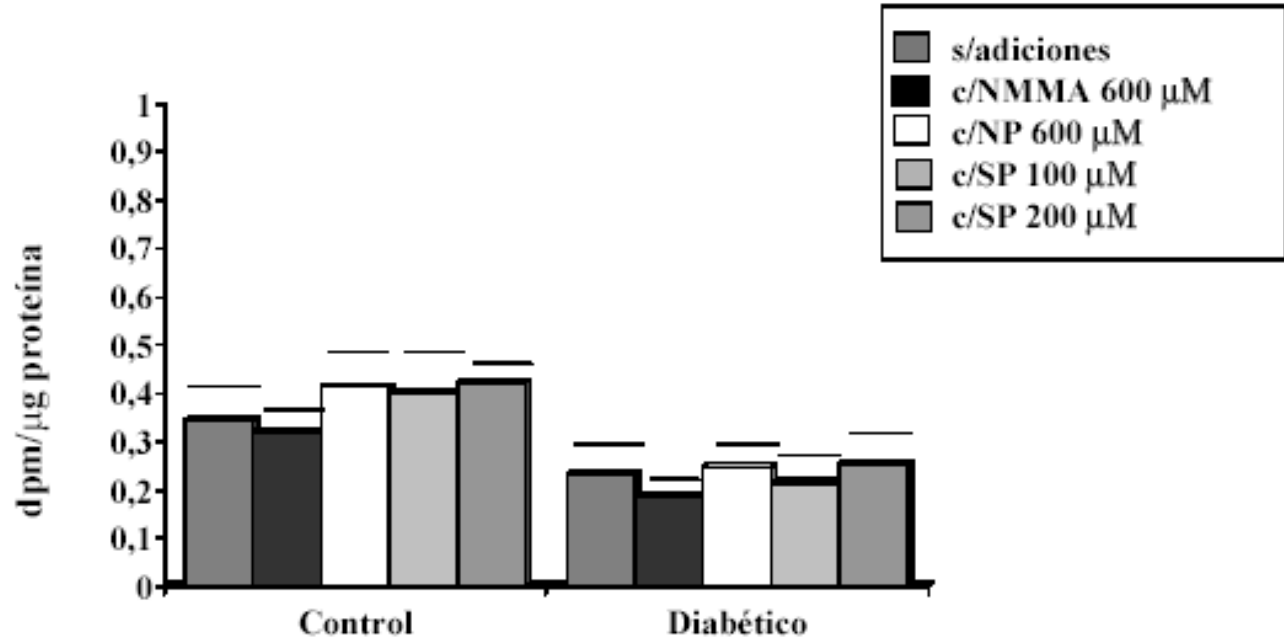


*** $p < 0.001$ ** $p < 0.01$ vs. control sin adiciones

$p < 0.05$ vs. diabético sin adiciones

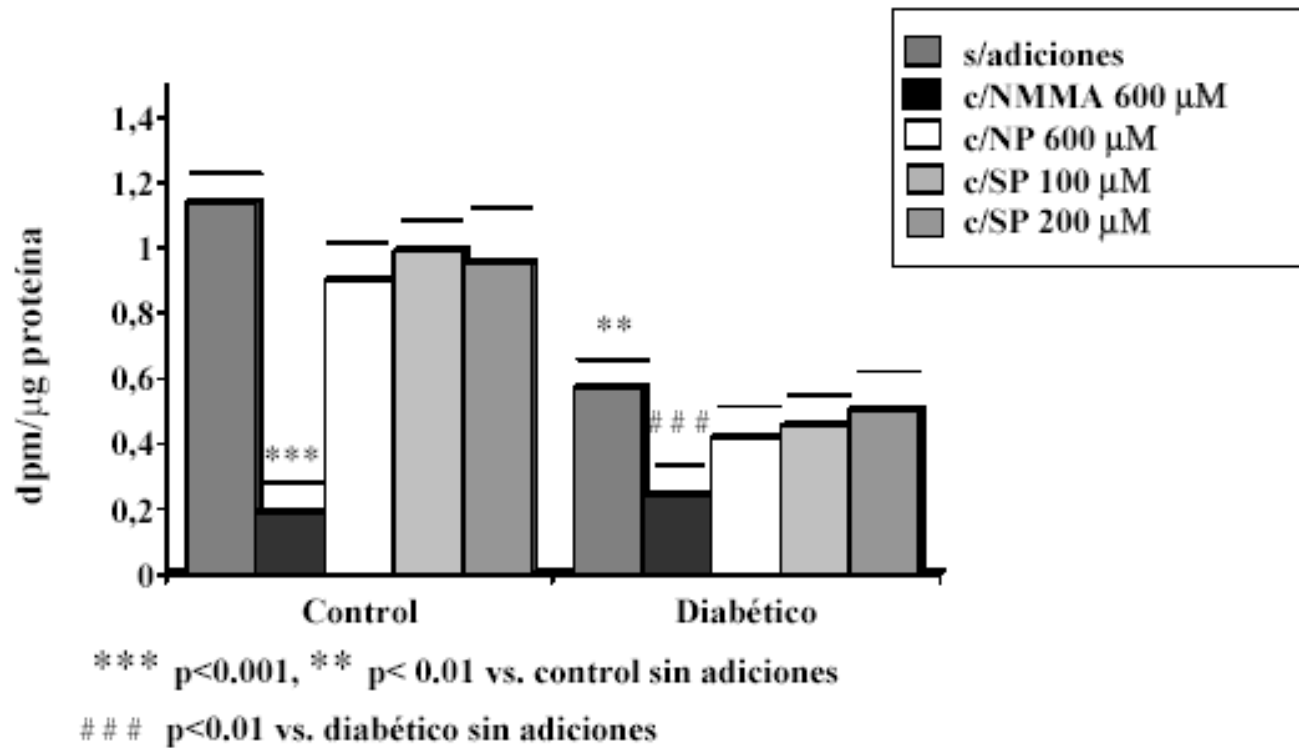
Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes ($n=8$). Test estadístico: ANOVA.

Figura 35: Síntesis *de novo* de colesterol en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de NO



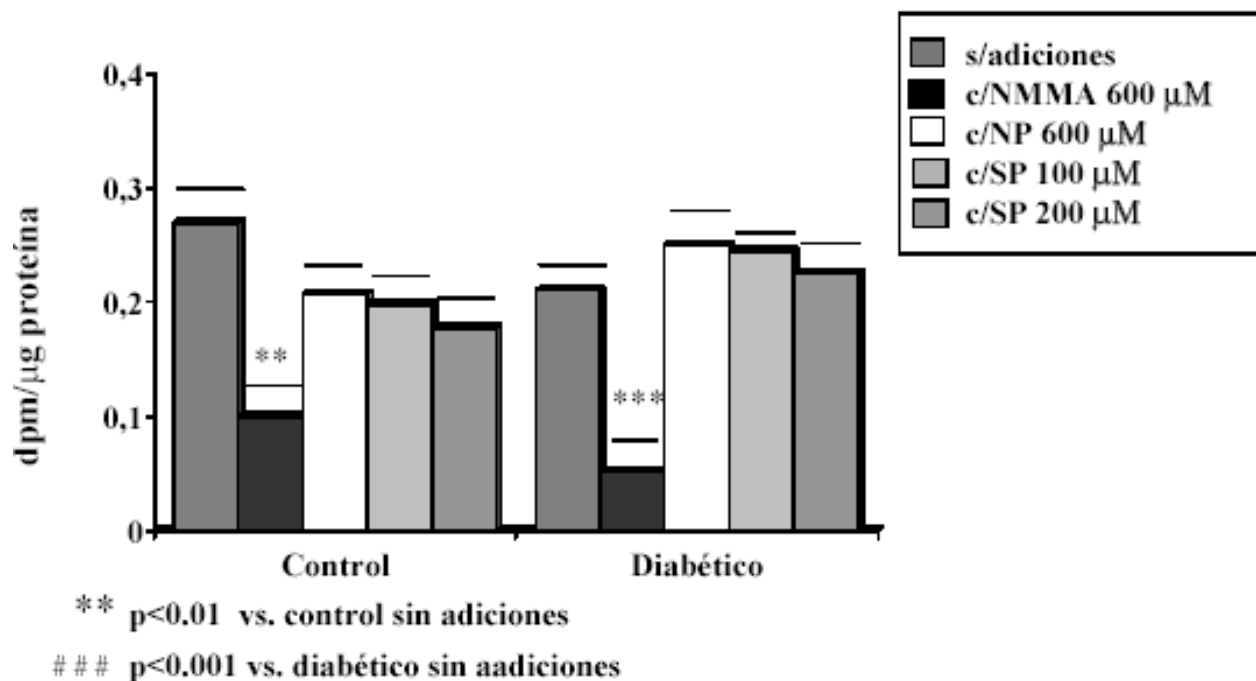
Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

Figura 36: Síntesis *de novo* de triglicéridos en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de NO



Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

Figura 37: Síntesis *de novo* de ésteres de colesterol en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de NO

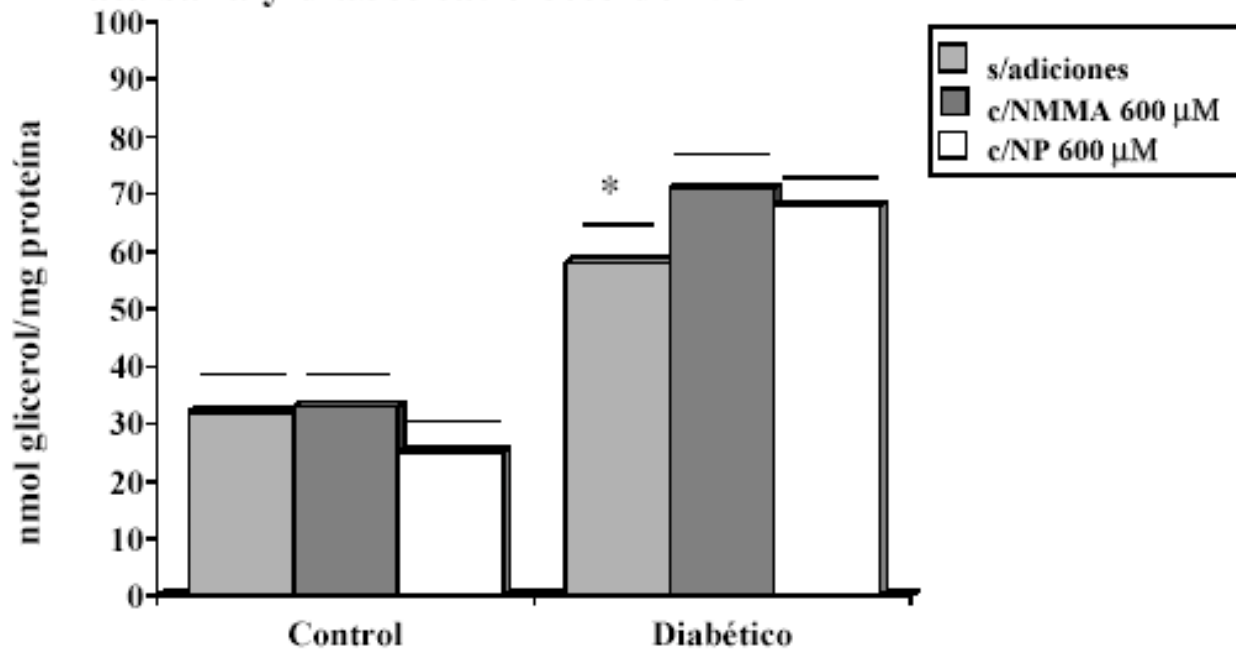


Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes (n=8). Test estadístico: ANOVA.

Catabolismo lipídica en placenta de rata sana y diabética: Efecto de NO

Existen evidencias de que el NO actúa promoviendo el catabolismo lipídico en adipocitos. (Frübeck y col 2001b) Se incubó tejido sano y diabético en presencia o ausencia de un dador de NO (NP 600μM) y de un inhibidor de NOS (NMMA 600μM), y se evaluó la liberación de glicerol por tejido placentario de rata sana y diabética al medio de incubación. En la Figura 38 se observa que el NO no tiene efecto sobre el catabolismo lipídico, en tejido placentario de rata sana y diabética, ya que ni el agregado de NO exógeno, ni la inhibición de la síntesis endógena del mismo modificaron los niveles de glicerol liberados por la placenta.

Figura 38: Catabolismo lipídico en placenta a término de rata sana y diabética: efecto de NO



* $p < 0.05$ vs control sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario provenientes de animales diferentes ($n=8$). Test estadístico: ANOVA.

Alteraciones placentarias en la mujer con diabetes pre-gestacional y gestacional

La diabetes gestacional se manifiesta durante el segundo o tercer trimestre de embarazo cuando el páncreas endocrino no puede satisfacer la demanda incrementada de insulina propia del estado de preñez. Generalmente este tipo de patología es controlada con una dieta rigurosa y no requiere el suplemento de insulina. La diabetes pre-gestacional es aquella diagnosticada en una etapa previa al embarazo. Su severidad es habitualmente mayor, debido al tiempo de exposición de los tejidos a la hiperglucemia y a los bajos niveles endógenos de insulina con los que llega la paciente al comienzo de su gestación. La patología pre-gestacional puede ser de tipo 1 o tipo 2,

aunque esta última es menos frecuente. Por lo general el control metabólico depende en este caso de la administración exógena de insulina.

En cuanto a las anomalías placentarias, ambos tipos de diabetes originan alteraciones morfológicas, edema, disfunción placentaria, y disminución del flujo placentario (Eriksson y col 1984, Teasdale y col 1981 y Teasdale y col 1983). La ocurrencia de los eventos mencionados está estrechamente relacionada con el control metabólico de la glucemia materna. (Bjork y col 1984)

Como paso previo al estudio de la interrelación entre leptina y NO en la placenta de mujeres sanas y diabéticas, analizamos las características de las pacientes estudiadas.

En la Tabla 10 observamos que las pacientes con diabetes gestacional presentan glucemias ligeramente elevadas e intolerancia a la glucosa mientras que las pacientes con diabetes pregestacional muestran incremento en sus glucemias basales, pero evidentemente controladas por la terapia insulínica. Asimismo, estas últimas presentan niveles muy elevados de fructosamina, signo de altos índices de glicosilación, mientras que las pacientes con diabetes gestacional muestran sus niveles de fructosamina dentro de parámetros normales.

En los tres grupos el 50% de las pacientes tuvieron parto normal y el 50% tuvieron sus bebés por cesárea. No se observan malformaciones congénitas entre la descendencia de las pacientes sanas. Se detecta un bebé macrosómico en el grupo de diabéticas gestacionales; y un caso de distress respiratorio y otro de hipoglucemia neonatal entre la descendencia de pacientes diabéticas pregestacionales.

Tabla 10: Características de pacientes sanas, diabéticas gestacionales y pre-gestacionales (tipo 1)

	Pacientes sanas n=12	Diabéticas Gestacionales n=11	Diabéticas Insulino dependientes n=9
Tratamiento	Ninguno	Dieta	Insulina
Glucemia (mg/dl)	72±4	104 ±4 * post carga 160 ±5 ##	160 ±13 **
Fructosamina (µmol/L)	-	186 ±5	310 ±11
Parto	Semana 39±1	Semana 38±1	Semana 38±1
Peso fetal (g)	3272±131	3470±169	3271±125
Patología fetal	Ninguno	Macrosomía (1)	Distress respiratorio(1) Hipoglucemia neonatal(1)

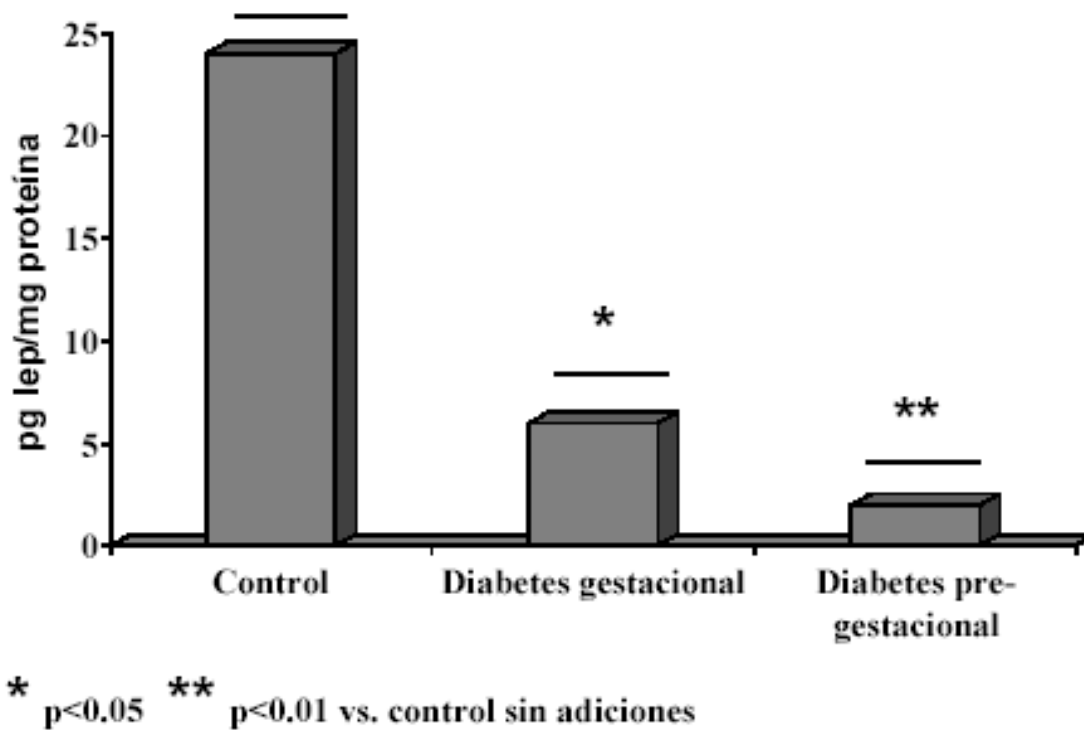
Los valores representan el promedio ± error estándar. *p<0.05, **p<0.01 con respecto al control
con respecto al valor de diabéticas gestacionales previo al tratamiento con glucosa. Test estadístico:
ANOVA. Valores de fructosamina normales hasta 285 µmol/L

Niveles de leptina en la placenta a término de paciente sana y con Diabetes Mellitus

La leptina plasmática aumenta moderadamente durante el primer trimestre del embarazo en la mujer, para luego aumentar abruptamente durante el segundo trimestre. A partir de allí su niveles se mantienen estables, y descienden luego del parto. (Henson y col 2000) Estos incrementos son atribuidos a la producción placentaria de leptina. Hay autores que correlacionan los niveles de

leptina con los de insulina plasmática. Otros estudios han descripto (Coya y col 2001) que la insulina es un estimulador de la síntesis y liberación de leptina en trofoblastos. En nuestro estudio se realizó una evaluación del contenido de leptina en tejido placentario humano de pacientes sanas, con diabetes gestacional y pre-gestacional. Se observa que las pacientes con diabetes gestacional presentan una disminución del 75% en el contenido de leptina. En las pre-gestacionales, esa disminución llega a un 91% con respecto a las pacientes sanas ($p < 0.05$ y $p < 0.01$ respectivamente) (Figura 39).

Figura 39: Producción de Leptina placentaria en pacientes sanas y diabéticas



Los datos expresan el promedio \pm el error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 9 muestras de tejido placentario a término proveniente de mujeres sanas, con diabetes gestacional y con diabetes pre-gestacional ($n=9$). Test estadístico: ANOVA

Producción de óxido nítrico. Efecto de leptina

Como ya se expresara, el NO es un agente vasoactivo que tiene un rol primordial en el establecimiento del flujo sanguíneo de la unidad feto-placentaria, como vasodilatador e inductor de angiogénesis. (Syal y col 1999)

La placenta de pacientes diabéticas muestra signos de alteraciones en el flujo sanguíneo. Se observan edemas, coágulos, una mayor cantidad de vasos sanguíneos y capilares, una cantidad incrementada de vellosidades inmaduras y un engrosamiento de la membrana basal. (Teasdale y col 1981 y Teasdale y col 1983) Estas anomalías son consecuencia del desequilibrio entre los niveles inadecuados de sustancias vasoactivas y las adaptaciones tendientes a mejorar la transferencia bilateral materno-fetal.

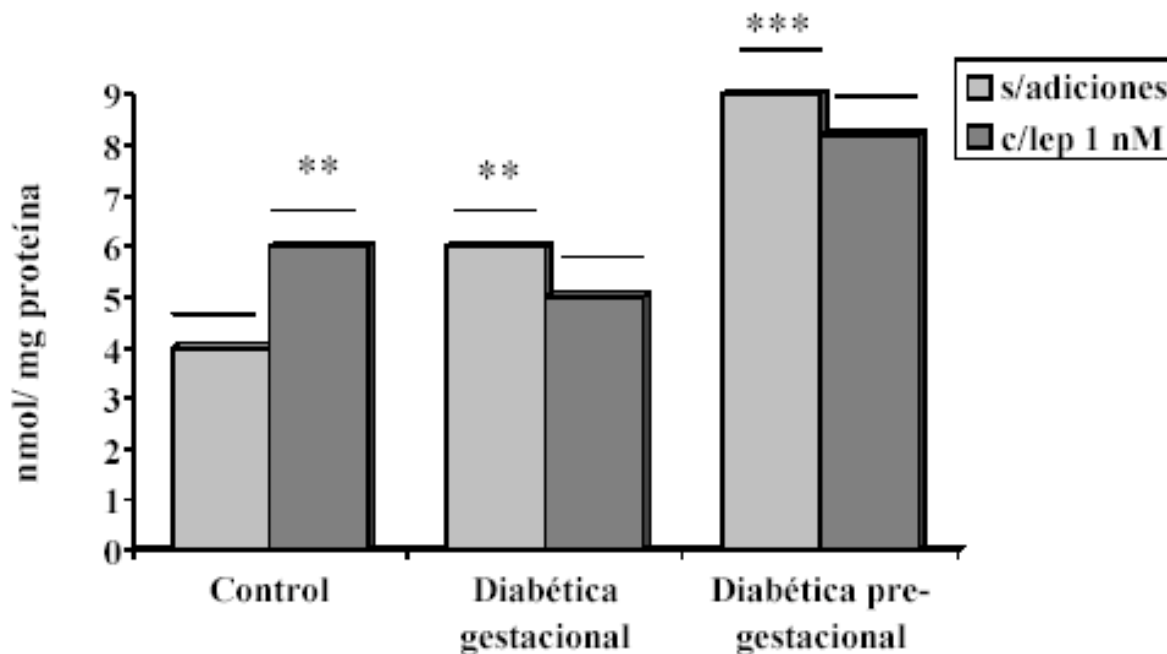
Niveles placentarios de NO

Conociendo la importancia que tiene el NO en la regulación del tono vascular y en la modulación de la producción de otros agentes vasoactivos, se evaluó la producción de NO en placenta de mujeres sanas, con diabetes gestacional y pre-gestacional. Para ello se cuantificó el contenido de nitratos y nitritos por el método de Griess, en tejido placentario a término de pacientes sanas y diabéticas. En la figura 40 se observa que los niveles de NO están incrementados en un 50% en la placenta de pacientes con diabetes gestacional ($p < 0.05$) y en un 125% ($p < 0.001$) en las pacientes con diabetes pre-gestacional.

Regulación de la producción de NO por leptina

Dados nuestros resultados previos, que determinan que la adición de leptina produce un incremento en la producción de nitratos y nitritos en placenta de rata sana y diabética (Figura 30), se evaluó en esta etapa el efecto de la adición de leptina en la producción de NO en placenta humana de pacientes sanas y diabéticas pre-gestacionales y gestacionales. En la Figura 40 se observa que la presencia de leptina 1nM en el medio de incubación incrementa en un 50% la producción de NO en placenta de mujeres sanas ($p < 0.01$), sin embargo no tiene efecto en placenta de mujeres con diabetes gestacional o pre-gestacional.

Figura 40: Niveles de nitratos/nitritos en placenta humana a término: efecto de leptina



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. control sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm el error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 9 muestras de tejido placentario a término proveniente de mujeres sanas, con diabetes gestacional y con diabetes pre-gestacional (n=9). Test estadístico: ANOVA

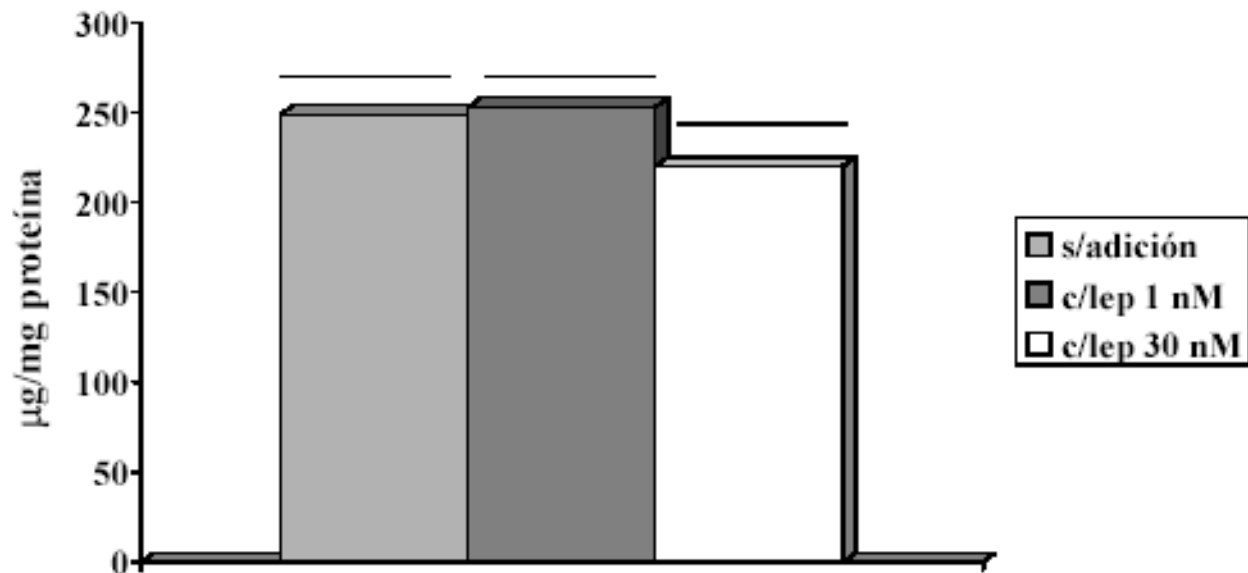
Efectos de leptina sobre el metabolismo lipídico en la placenta humana

Niveles de lípidos en la placenta humana: Efecto de leptina

Dados los efectos de esta hormona sobre el metabolismo lipídico placentario en rata, quisimos analizar sus efectos sobre este parámetro en tejido placentario humano. Con este objetivo se evaluó el contenido lipídico, y posteriormente el efecto de la adición de dos concentraciones de leptina (1 y 30 nM). En las Figuras 41 a 44, se puede observar que la menor concentración de leptina provoca una disminución de un 28% ($p < 0.05$) en el contenido de triglicéridos (Figura 43), y que la

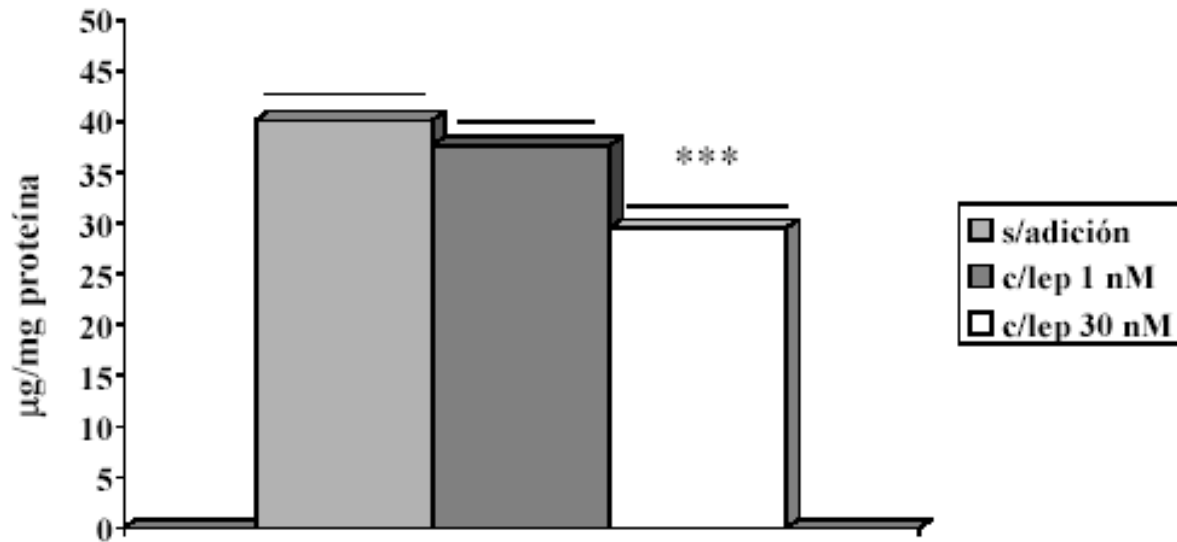
adición de leptina 30 nM disminuye la masa de triglicéridos en un 51% ($p < 0.01$) (Figura 43) y la de colesterol en un 26% ($p < 0.001$) (Figura 42).

Figura 41: Niveles de fosfolípidos en placenta a término: efecto de leptina



Los datos expresan el promedio \pm el error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario a término proveniente de mujeres sanas ($n=8$). Test estadístico: ANOVA

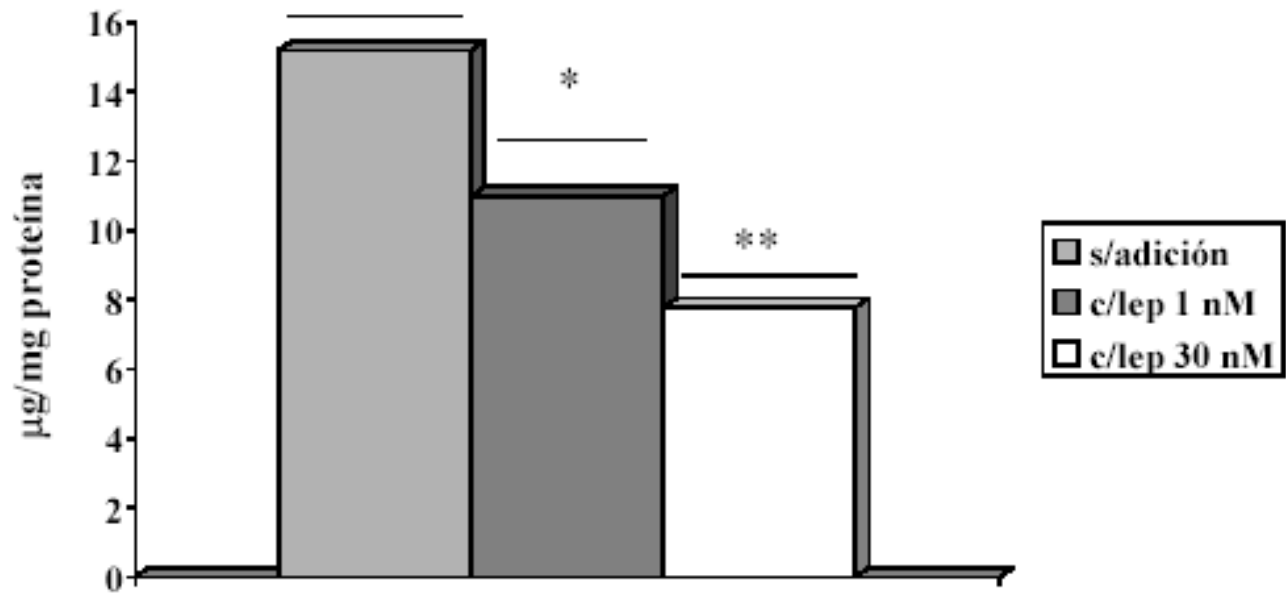
Figura 42: Niveles de colesterol en placenta a término: efecto de leptina



*** $p < 0.001$ vs. control sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm el error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario a término proveniente de mujeres sanas (n=8). Test estadístico: ANOVA

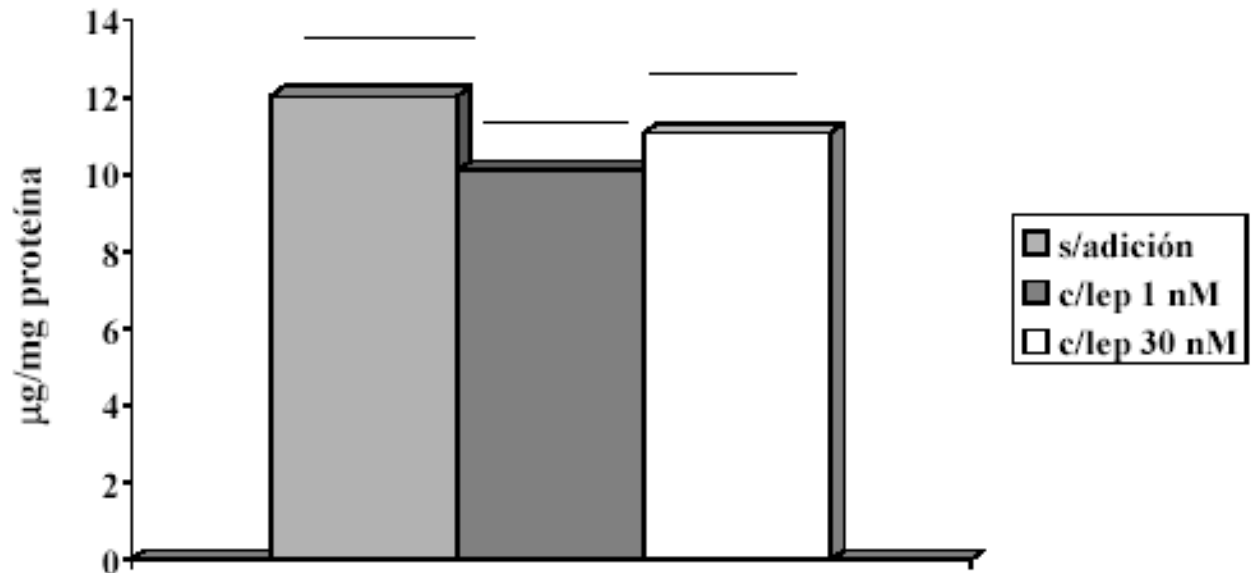
Figura 43: Niveles de triglicéridos en placenta a término: efecto de leptina



* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. control sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm el error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario a término proveniente de mujeres sanas ($n=8$). Test estadístico: ANOVA

Figura 44: Niveles de ésteres de colesterol en placenta a término: efecto de leptina

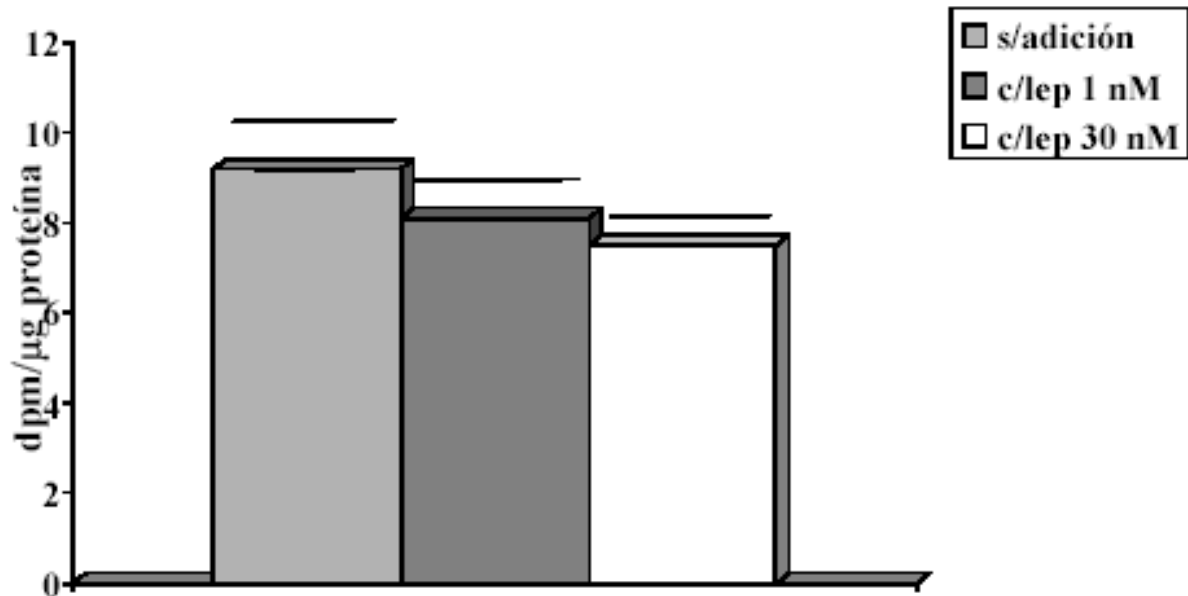


Los datos expresan el promedio \pm el error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario a término proveniente de mujeres sanas (n=8). Test estadístico: ANOVA

Síntesis lipídica *de novo* en la placenta humana: Efecto de leptina

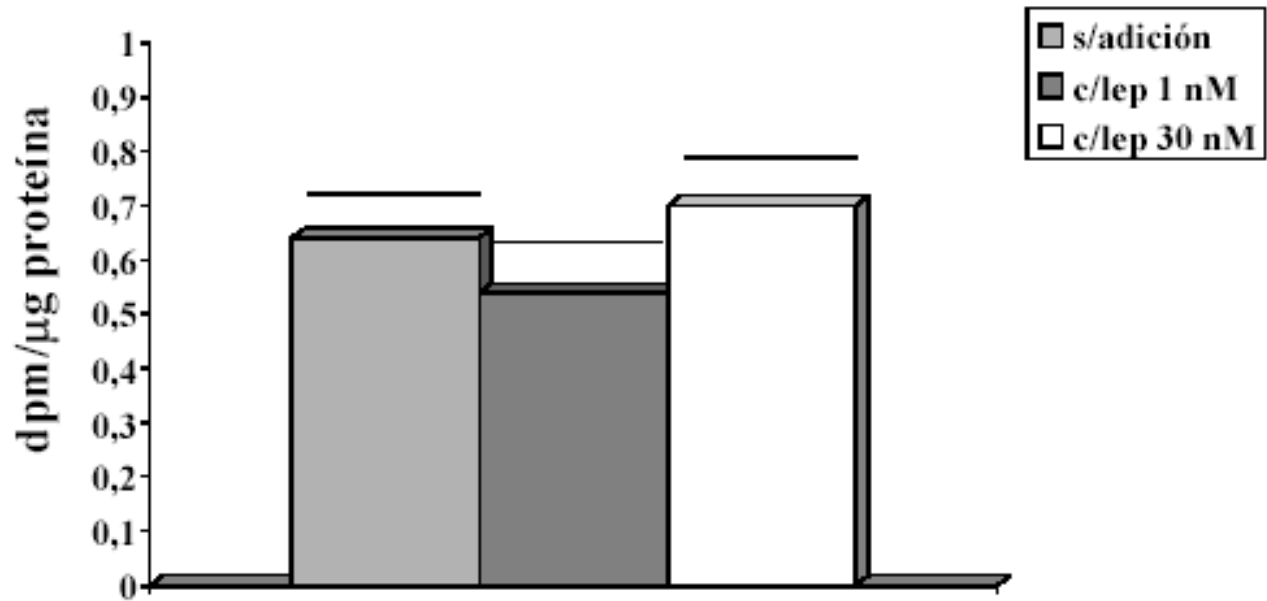
En esta parte del trabajo se evaluó el efecto de leptina sobre la síntesis de lípidos a partir de [14 C-acetato]. Para ello se incubó el tejido placentario, con el trazador radioactivo y en presencia o ausencia de dos concentraciones de leptina, (1 y 30 nM). Posteriormente se cuantificó la radioactividad incorporada a las distintas especies lipídicas, no observándose efecto alguno sobre la síntesis *de novo* de lípidos placentarios (Figuras 45 a 48).

Figura 45: Síntesis *de novo* de fosfolípidos en placenta a término: efecto de leptina



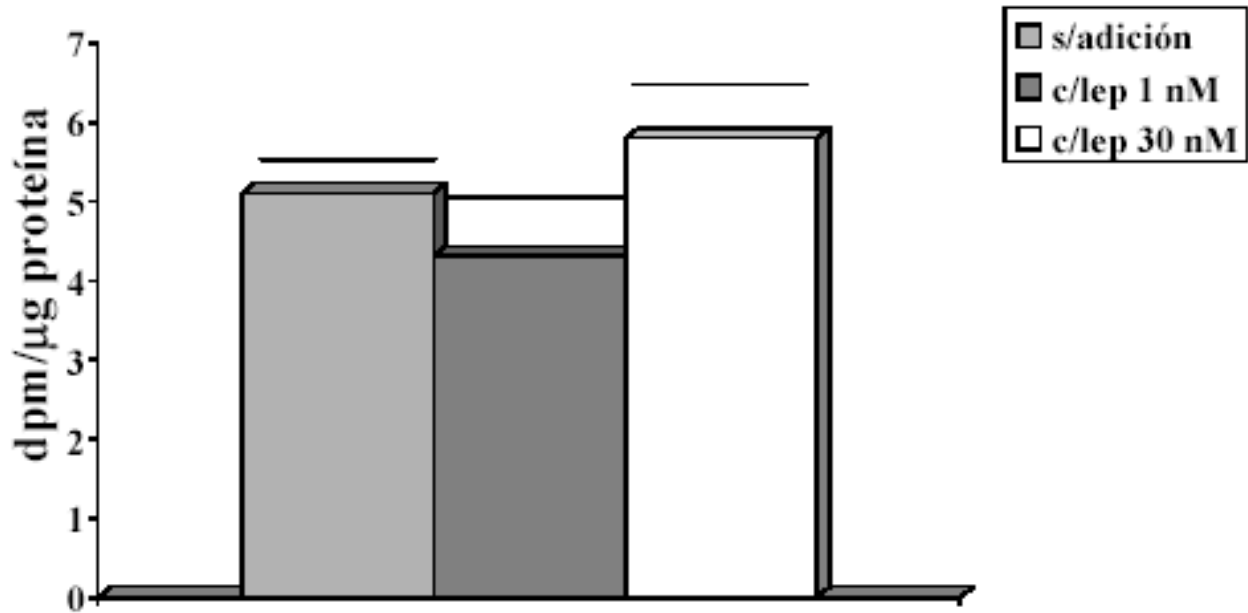
Los datos expresan el promedio \pm el error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario a término proveniente de mujeres sanas (n=8). Test estadístico: ANOVA

Figura 46: Síntesis *de novo* de colesterol en placenta a término: efecto de leptina



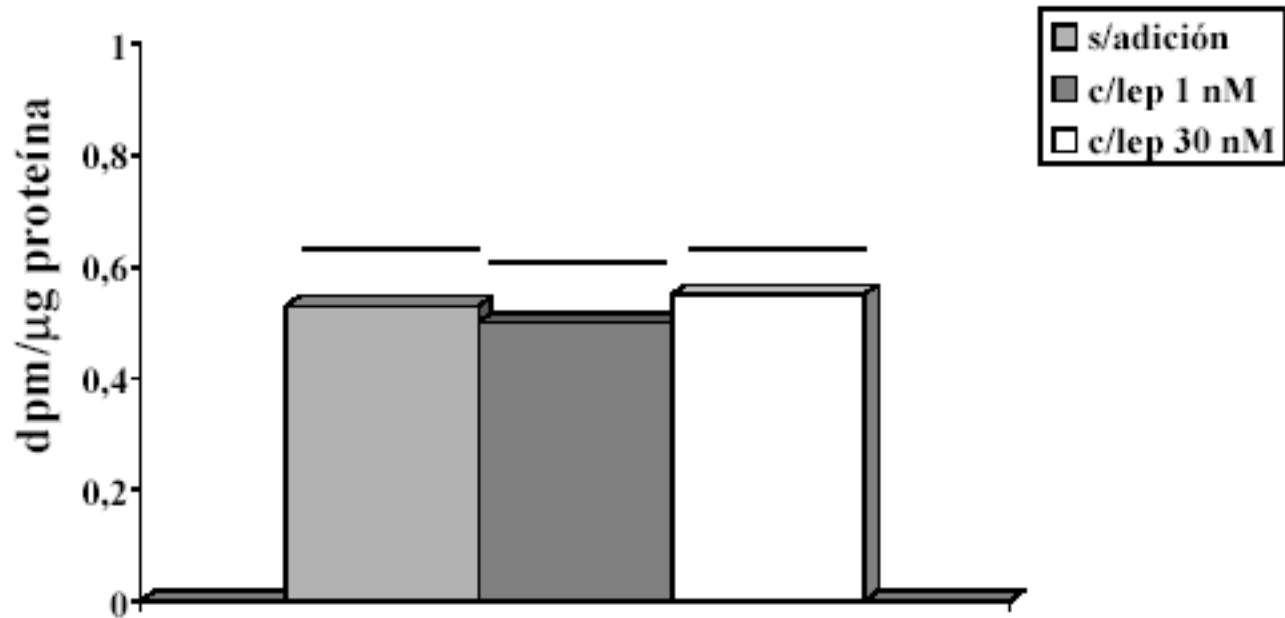
Los datos expresan el promedio \pm el error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario a término proveniente de mujeres sanas (n=8). Test estadístico: ANOVA

Figura 47: Síntesis *de novo* de triglicéridos en placenta a término: efecto de leptina



Los datos expresan el promedio \pm el error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario a término proveniente de mujeres sanas (n=8). Test estadístico: ANOVA

Figura 48: Síntesis *de novo* de ésteres de colesterol en placenta a término: efecto de leptina

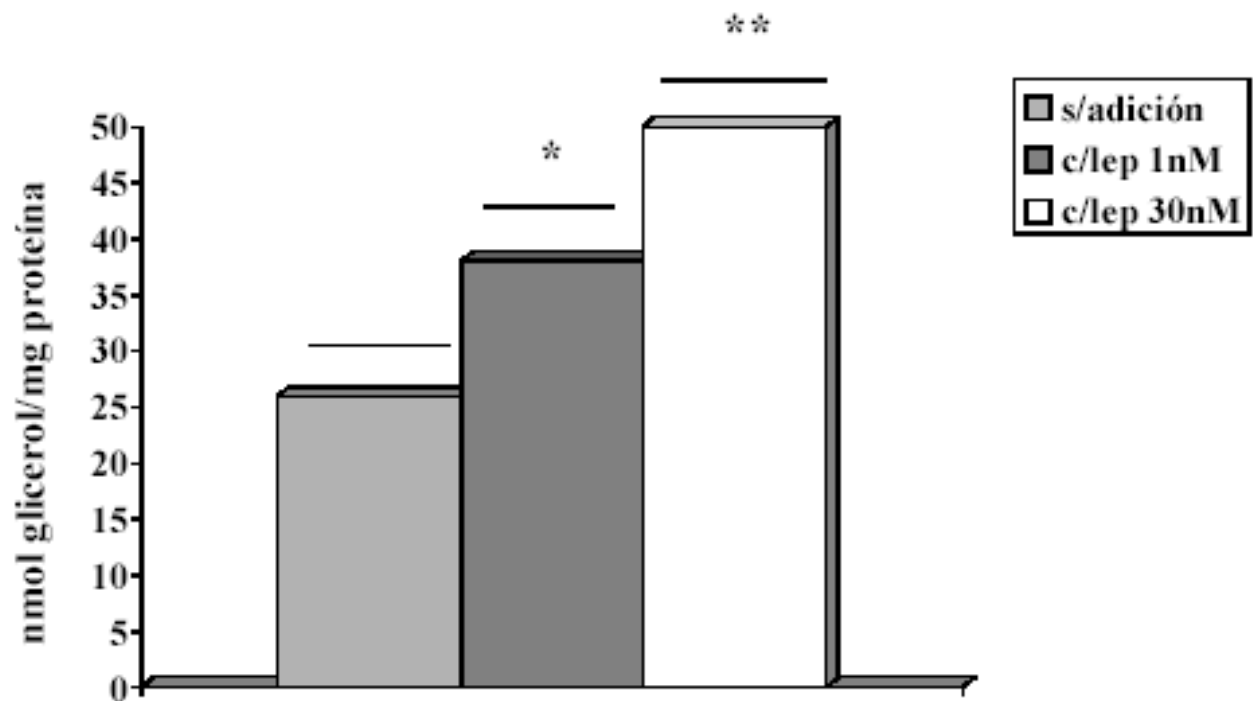


Los datos expresan el promedio \pm el error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de tejido placentario a término proveniente de mujeres sanas (n=8). Test estadístico: ANOVA

Catabolismo lipídico en la placenta humana: Efecto de leptina

Se utilizó la producción de glicerol como índice del catabolismo lipídico. En esta etapa del trabajo se evaluó la capacidad de leptina de regular la lipólisis. Se incubó tejido placentario proveniente de pacientes sanas en baño metabólico en presencia o ausencia de dos concentraciones de leptina (1 y 30 nM), luego se evaluó el catabolismo lipídico mediante la cuantificación de glicerol liberado al medio de incubación. En la Figura 49 se observa que el agregado de leptina 1 y 30 nM produce un aumento del 61% ($p < 0.05$) y 93% ($p < 0.01$) respectivamente en el catabolismo lipídico placentario en mujeres sanas.

Figura 49: Catabolismo lipídico en placenta a término



* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs. control sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm el error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron 8 muestras de medio de incubación de tejido placentario a término proveniente de mujeres sanas ($n=8$). Test estadístico: ANOVA

Cultivo de trofoblastos humanos

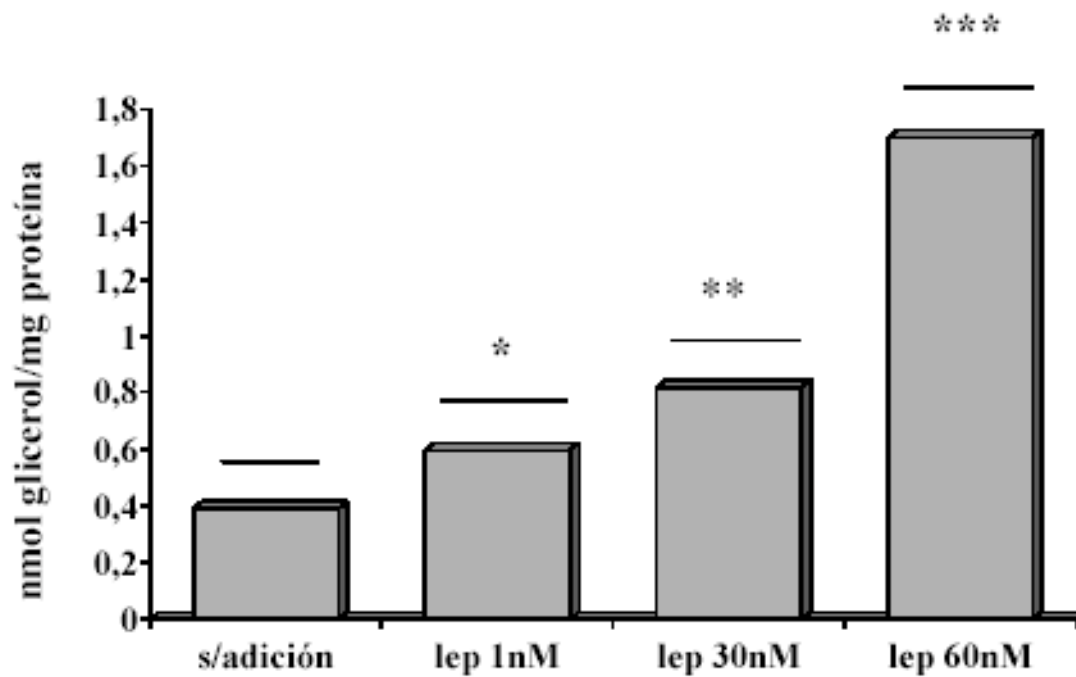
El cultivo celular primario es una herramienta que permite trabajar con una población enriquecida en un tipo celular, por un tiempo prolongado. El cultivo de trofoblastos humanos fue descrito por Klimann (Klimann y col 1986) y luego modificado por varios autores (Guibourdenche y col 2000, Frank y col 2001). En el proceso de selección del tipo celular se eligen únicamente los trofoblastos mononucleares que, sembrados en las condiciones adecuadas, llevan a cabo un proceso de fusión celular para formar los sincicios característicos de las vellosidades placentarias humanas. Otros autores indicaron la presencia del receptor de leptina y se ha reportado el efecto de leptina sobre la producción hormonal en el mencionado cultivo. (Cameo y col 2003)

Los sincicios trofoblásticos cubren las vellosidades terciarias y son las estructuras que están en contacto con la sangre materna, donde se produce el intercambio materno-fetal. Del correcto funcionamiento metabólico trofoblástico dependerá la transferencia materno-fetal de sustancias. En esta etapa del trabajo quisimos evaluar la posibilidad de que el metabolismo lipídico trofoblástico estuviera modulado por leptina.

En una primera aproximación al trabajo con trofoblastos sinciciales, se cultivaron los trofoblastos durante 72 hs. dando lugar a la formación de sincicios, luego de lo cual se suplementó el medio con distintas concentraciones de leptina: (1, 30 y 60 nM), para después evaluar el catabolismo lipídico mediante la cuantificación del glicerol liberado al medio de cultivo. En la Figura 50 se observa que la adición de leptina produce un aumento significativo de la liberación de glicerol que se incrementa en forma dosis dependiente hasta un 330 % ($p < 0.001$).

De esta forma, se ha identificado al trofoblasto como uno de los tipos celulares involucrados en la regulación de leptina sobre el metabolismo lipídico placentario. Este resultado preliminar sienta las bases para futuros estudios, en los que será de interés profundizar acerca de la función reguladora de la leptina, sobre el metabolismo lipídico en trofoblastos aislados de pacientes sanas y diabéticas.

Figura 50: Catabolismo lipídico en cultivo de trofoblastos humanos



* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ vs. control sin adiciones

Los datos expresan el promedio \pm el error estándar. Los cultivos de células trofoblásticas fueron realizados a partir de 6 placentas a término provenientes de mujeres sanas. En cada uno de los cultivos, para cada grupo experimental y por triplicado, se realizó el dosaje del glicerol liberado al medio de cultivo durante 24 hs. (n=6). Test estadístico: ANOVA

Discusión

La patología diabética induce anomalías reproductivas que afectan el desarrollo embrionario y la función placentaria, alteraciones que originan incrementos en los índices de aborto espontáneo, malformaciones congénitas, morbilidad-mortalidad neonatal y enfermedades crónicas en la vida adulta del hijo de madre diabética. (Dunne y col 2003, Aerts y col 2003, Evers y col 2004)

Dada la alta incidencia y las dificultades en el correcto control metabólico de la enfermedad, cobra especial relevancia el estudio de los mecanismos involucrados en las anomalías embrionarias y placentarias inducidas por la diabetes. En particular, el objetivo principal de este estudio ha sido el de analizar en el embrión y en la placenta las probables acciones autócrinas y/o parácrinas de la leptina, y evaluar en la patología diabética la presencia de alteraciones en los niveles de leptina y/o sus funciones en la gestante diabética, conceptos que pueden ayudar a esclarecer si dichas fallas están involucradas en la inducción de anomalías embrionarias y placentarias.

El modelo experimental, obtenido por administración neonatal de estreptozotocina, ha sido ampliamente utilizado por diversos autores y por nuestro grupo de trabajo. (Portha y col 1994, Jawerbaum y col 1996a, Movassat y col 1997, Tormo y col 1997) La destrucción y regeneración de las células beta pancreáticas en el período neonatal da lugar en el animal adulto a un modelo caracterizado por glucemias basales moderadamente elevadas y niveles de insulina reducidos en respuesta a la administración de glucosa, indicando intolerancia a la glucosa.

Asimismo, y debido al principal objetivo de este trabajo de tesis, se dosaron los niveles plasmáticos de leptina en la rata sana y diabética. Nuestros resultados muestran que dichos niveles se encuentran disminuidos en este modelo experimental de diabetes. A este respecto, hay trabajos que señalan una correlación entre los niveles de insulina y de leptina plasmáticos (Sivitz y col 1998) y describen asimismo que la insulina es inductora de la producción adipocitaria de leptina, mayor contribuyente a la leptinemia de los animales no preñados. (Cusin y col 1995, Ceddia y col 1998) En este sentido, se ha observado que el transporte y metabolización de glucosa por el adipocito sería lo que estimula la síntesis y secreción adipocitaria de leptina. (Havel 2000) Asimismo, se ha demostrado que la diabetes induce una disminución en la producción de leptina

por el tejido adiposo, y que la administración de insulina restaura los valores normales de glucemia y la producción adipocitaria de leptina. (Sivitz y col en 1996)

La insulinemia, la leptinemia y el grado de control metabólico parecen estar directamente relacionados. Se han reportado valores de leptinemia tanto elevados como disminuidos en pacientes diabéticos, probablemente relacionado con el tipo de tratamiento y grado de control metabólico logrado. (Abdegaldir y col 2002, Festa y col 1999 , Lea y col 2000, Leperq y col 1998)

Empleando el modelo descripto de diabetes moderado caracterizado por niveles basales de glucosa elevados, intolerancia a la glucosa y bajas concentraciones de leptina circulante, hemos iniciado el presente trabajo de tesis evaluando los niveles de leptina en embriones de rata sana y diabética y el efecto de la hormona sobre el desarrollo y metabolismo embrionarios durante la etapa de organogénesis temprana.

La organogénesis temprana es el período de desarrollo embrionario que lleva a la formación de los primordios de los órganos; en esta etapa se definen las estructuras que darán lugar a la formación de los órganos y los grandes sistemas. El sistema nervioso central se origina a partir del neuroectodermo que forma primeramente la placa neural, con la posterior diferenciación en un surco, elevación y aposición de los pliegues neurales y finalmente el cierre formando un tubo neural que dará lugar a la diferenciación de los componentes del sistema nervioso. Se conforman también en esta etapa las somitas, estructuras mesodérmicas que se forman de a pares a los lados del tubo neural y que originan parte de la columna vertebral, costillas y músculos intercostales. Por otra parte y también en este período se forma el corazón primitivo, a partir del mesodermo diferenciado en la región cardiogénica. El corazón, si bien primitivo, ya tiene actividad pulsátil, aún antes de que la función cardíaca esté establecida. También se conforman los primordios de los órganos componentes de los sistemas respiratorio y digestivo. En roedores ocurre un movimiento de rotación axial por el cual el embrión expone su parte dorsal, ubicándola de manera convexa cuando antes lo hacía de manera cóncava, adoptando la posición fetal. (Kaufman y col 1999) En esta etapa, debido a la relativa accesibilidad a través del saco vitelino de sustancias potencialmente teratogénicas en un período en que se forman estructuras tan importantes como las mencionadas, el embrión es altamente susceptible a la aparición de malformaciones cuando se expone a un entorno materno anómalo. (New y col 1978, Buchanan y col 1985, Freeman y col 1994) El cierre del tubo neural, la morfología y la actividad cardíaca, el número de somitas y el estado de rotación axial son los parámetros morfológicos que se evaluaron

para determinar el grado de desarrollo embrionario y la aparición de malformaciones, además del contenido proteico embrionario como índice de crecimiento embrionario.

Tal como describimos en trabajos anteriores, y a pesar de que el modelo es de diabetes moderada, se observa retraso de crecimiento embrionario y mayor incidencia de malformaciones congénitas, principalmente en el cierre de tubo neural y la cardiogénesis. Dado que los valores de glucemia del modelo experimental utilizado son semejantes a aquellos que se observan en mujeres diabéticas gestantes, incluso bajo control insulínico o dietario, es de interés profundizar en el entendimiento de mecanismos que podrían estar relacionados con dichas anomalías.

La leptina es producida por el ovocito en un período anterior a la ovulación, y se encuentra relacionada con la capacidad para sintetizar otras hormonas. (Welt y col 2003) Previamente a la fecundación, la leptina mantiene su expresión de manera polarizada en el ovocito, co-localizando con STAT3, factor de transcripción relacionado con la vía de señalización de la leptina. Luego de la fecundación la polarización se mantiene aún hasta el estadio de mórula. (Antczak y col 1997)

En este trabajo se intentó cuantificar los niveles de leptina en el embrión en etapa de organogénesis temprana mediante EIA y RIA, sin embargo la sensibilidad de dichos métodos no fue suficiente. Se procedió a detectar la presencia y localización de la hormona mediante técnicas inmunohistoquímicas. Los resultados observados y cuantificados por densitometría en cortes parafinados de embriones provenientes de ratas sanas y diabéticas muestran que los niveles de leptina se encuentran disminuidos en embriones de rata diabética en relación al control. En concordancia con estos resultados, se dosaron los niveles de leptina por EIA en embriones explantados de rata sana y diabética en el día 13.5 de preñez, observándose una menor producción de esta hormona en los embriones de ratas diabéticas en relación al grupo control. De esta forma, nuestros resultados indican la presencia de leptina en el embrión en etapa de organogénesis, y su incremento durante el desarrollo embrionario. Este aumento puede deberse a una mayor capacidad de síntesis embrionaria, sin embargo, el establecimiento de la placenta funcional en el día 13 de gestación probablemente contribuya a un incremento en la transferencia de la hormona a través de la placenta. (Georgiades y col 2002, Malassine y col 2003, Smith y col 2003) Asimismo, es de interés la menor concentración de leptina presente en el embrión de rata diabética, y se requerirá de la definición de las funciones de leptina durante el desarrollo embrionario durante la organogénesis para poder comprender en forma completa las derivaciones de este hallazgo.

En este trabajo, y empleando el método de cultivo *in vitro* desarrollado por New y col, (New y col 1978) se evaluó la influencia de adiciones de leptina sobre el desarrollo embrionario durante la organogénesis temprana. Para ello, se realizaron cultivos de embriones provenientes de ratas sanas, explantados en el día 9.5 de gestación, y se cultivaron durante 24 horas en presencia de suero de ratas sanas y diabéticas, con o sin adiciones de leptina. Los resultados obtenidos muestran que el entorno diabético afecta al crecimiento y desarrollo embrionario, evaluado a través del contenido proteico y el diagnóstico morfológico. Al igual que lo que se observa *in vivo* en los embriones de animales diabéticos, hemos detectado anomalías en el desarrollo del tubo neural y el órgano cardíaco, y retraso o ausencia de rotación axial en los embriones de madre sana incubados en presencia de suero de ratas diabéticas. Estos resultados, descritos anteriormente tanto por nuestro grupo de trabajo como por otros autores, (Jawerbaum y col 2000, Wentzel y col 1999, Eriksson y col 2003) fueron empleados como base para identificar la participación de leptina en estos procesos. En el presente estudio, no hemos observado que la adición de leptina (1 y 30 nM) modifique el crecimiento y desarrollo de los embriones cultivados en presencia de suero diabético. Sin embargo en los embriones cultivados en presencia de suero de rata sana, la adición de leptina 30 nM induce la aparición de malformaciones congénitas, sugiriendo que la leptina en concentraciones elevadas tendría un efecto embriotóxico y revelando la importancia de un control adecuado de los niveles de leptina durante la gestación. En los embriones cultivados en presencia de suero de rata diabética, el efecto teratogénico de leptina no se evidencia, probablemente debido a que su acción se ejerza mediante vías similares a aquellas inducidas por el entorno diabético, o quizás revelando una probable contribución para contrarrestar alguno de los efectos dismorfogénicos que el entorno diabético induce.

El metabolismo lipídico es fundamental para la nutrición y el correcto desarrollo embrionario. El embrión depende totalmente del aporte de lípidos “formados” o bien de los precursores para la síntesis. En esta etapa, el pasaje de lípidos se realiza por transferencia lateral o bien por medio de la captación mediante receptores expuestos en la membrana vitelina y posterior liberación a la cavidad amniótica para ser tomados por el embrión. (Farese y col 1998) La regulación del metabolismo de los lípidos es muy importante ya que, además de representar un importante recurso energético como combustible celular, los mismos son parte constitutiva de membranas y participan en los mecanismos de señalización inter e intracelulares. Las anomalías

en el metabolismo lipídico embrionario promueven la aparición de graves trastornos en el desarrollo. En el período de organogénesis temprana se ha detectado actividad de una lipasa, (expresada principalmente en el neuroepitelio), la cual es exclusiva de este período del desarrollo. Lo antedicho sugiere un rol primordial para los lípidos en el desarrollo embrionario. (Lindegaard y col 2005). Otro hecho conocido es que la escasez de colesterol durante la organogénesis desencadena el síndrome Smith-Lemli-Opitz, (Repetto 1990, Wolf 1999) que implica malformaciones en el sistema nervioso central y en el desarrollo del corazón. Se ha observado que las alteraciones en el metabolismo de fosfolípidos producen anomalías en el desarrollo del sistema nervioso. (Fisher y col 2001) También se ha descrito que alteraciones en la transferencia lipídica a través del saco vitelino, finamente regulada, induce cambios adversos en el contenido lipídico de los embriones. (Raabe y col 1998, Farese y col 1996) Se conoce que los ácidos grasos y el colesterol están involucrados en la señalización de procesos que determinan la diferenciación y el desarrollo de estructuras embrionarias. El colesterol confiere hidrofobicidad a la proteína sonic-hedgehog determinándola a actuar en un área restringida, y el palmitato también es capaz de regular la hidrofobicidad de proteínas necesarias para el correcto desarrollo del sistema nervioso. (Porter y col 1996, Ueno y col 2000)

En el modelo de diabetes empleado, si bien los niveles de fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol no se encuentran afectados, se observa una menor síntesis *de novo* de triglicéridos y ésteres de colesterol a partir de acetato. Si bien esta alteración podría ser un efecto compensatorio de la mayor transferencia lipídica materna, también sería potencialmente perjudicial para los procesos que requieren la síntesis de lípidos específicos, en espacio y tiempo determinados para el correcto desarrollo del embrión.

Es importante y clara la función de la leptina como reguladora del metabolismo lipídico. En efecto la leptina es un regulador positivo de la oxidación de ácidos grasos, inhibiendo también la incorporación de los mismos a los triglicéridos en músculo esquelético y adipocitos. (Frühbeck y col 2002, Muoio y col 1999, Ceddia y col 1998) Estos efectos lipolíticos son también observados en páncreas. (Ceddia y col 1998, Shimabukuro y col 1997)

Nuestros resultados indican que la adición de leptina no modifica los niveles de triglicéridos, colesterol, ésteres de colesterol o fosfolípidos en el grupo control. Sin embargo en los embriones diabéticos, donde los niveles de leptina están disminuidos, se observa un claro efecto modulador negativo de leptina sobre el contenido de fosfolípidos, colesterol y ésteres de

colesterol. Esta acción parece ser resultado de un aumento en el catabolismo lipídico, ya que la adición de leptina no modifica la síntesis *de novo* de lípidos en embriones de rata sana ni de rata diabética. Dado que los niveles de lípidos deben estar finamente regulados durante la organogénesis temprana, (Farese 1996) la diferencia entre la acción lipolítica de la leptina que se observa en el embrión de rata diabética y no en el embrión de rata sana, puede deberse a que quizás esta acción se active sólo ante un entorno materno que implique una mayor transferencia de lípidos, con el objeto de evitar una anormal acumulación lipídica durante el desarrollo embrionario.

De esta forma, nuestros resultados indican que la leptina está involucrada en la regulación del metabolismo lipídico embrionario, modulación evidenciada en los embriones de ratas diabética.

La diabetes induce importantes anomalías en el metabolismo nitridérgico. En diferentes tejidos diabéticos se observan niveles alterados de NO y sobreexpresión de iNOS y de eNOS. (Sato y col 2005, Bitar y col 2005, Madar y col 2005, Bisseling y col 2003) En el desarrollo embrionario el NO actúa como un morfógeno de influencia crucial. Estudios realizados *in vivo* e *in vitro* señalan la importancia de la regulación de la producción de NO durante el desarrollo del embrión, habiéndose observado anomalías en el desarrollo cardíaco, en el sistema nervioso y en las extremidades originadas por inadecuados niveles intraembrionarios de NO. (Bloch y col 1999, Lee y col 1994) Nuestros trabajos previos señalan un incremento en la producción de NO en embriones de ratas diabéticas. (Jawerbaum y col 1998 b, Jawerbaum y col 2001, Jawerbaum y col 2005 b). En forma interesante, se ha observado que la leptina es reguladora del metabolismo nitridérgico aumentando los niveles de NO. Más aún se cree que en algunos casos el mecanismo de acción de leptina involucra al NO como mediador. La leptina aumenta los niveles de NO en diferentes tejidos. Su agregado modula la esteroidogénesis en células de la granulosa, y se cree que esta modulación estaría mediada por NO ya que la inhibición de la NOS anula el efecto regulatorio de la hormona sobre estos cultivos. (Huang y col 2005) En células del sistema inmune (Dixit y col 2003) y en células hipofisarias (Baratta y col 2002) la leptina induce la expresión y síntesis de hormona de crecimiento, y esta inducción es dependiente de la actividad NOS y de los niveles de NO respectivamente. Por otro lado, trabajando en modelos murinos, el grupo de Frühbeck

(Frühbeck y col 2001 b) demostró que la administración de leptina produce un incremento dosis dependiente de los niveles plasmáticos de NO, mientras que agentes bloqueantes de la actividad NOS originan una inhibición del efecto lipolítico en adipocitos.

Teniendo en cuenta las alteraciones que induce la diabetes sobre la producción de NO y los niveles de leptina en el embrión de madre diabética, se investigó el efecto de leptina sobre la producción embrionaria de NO. A diferencia de lo observado en otros tejidos, y señalando las particularidades del embrión en desarrollo, nuestros resultados muestran que la leptina (1 nM) regula negativamente la producción de NO en embriones de ratas sanas y diabéticas. Sin embargo, a altas concentraciones (leptina 30 nM) este efecto no se evidencia. Estas características reflejan la variabilidad en cuanto a mecanismos de acción de la hormona en estudio, que presenta múltiples receptores (Sinha y col 1996, Housecknecht y col 1998, Margetic y col 2002, Bates y col 2003) y que muestra diferentes respuestas a variadas concentraciones. En este sentido, el efecto de leptina sobre la oxidación de ácidos grasos en músculo y tejido adiposo se observa a altas concentraciones que van desde 60 hasta 120 nM (Muioio y col 1999, Frühbeck y col 2002); sin embargo el efecto estimulador de la producción de NO y de estradiol por parte de las células de la granulosa se evidencia a concentraciones entre 0.1 y 1 nM. (Huang y col 2005)

Dado que la leptina regula negativamente los niveles de NO embrionarios, y que los niveles endógenos de leptina están disminuidos en el embrión de rata diabética, los bajos niveles de esta hormona podrían ser una de las causas de la elevada producción de NO que afecta el desarrollo embrionario en la patología diabética.

La placenta es el órgano que regula el suministro fetal de nutrientes y oxígeno. A tal efecto debe contar con la estructura, tamaño y función metabólica adecuada. La diabetes induce alteraciones estructurales, bioquímicas y metabólicas en el tejido placentario. (Diamant y col 1978, 1980, Georgiades y col 2002) Esta patología provoca inmadurez en las vellosidades y bajo grado de diferenciación y especialización trofoblástica, lo que impacta negativamente en la eficiencia en el transporte de oxígeno y nutrientes. (Georgiades y col 2002) La hiperplasia placentaria, observada en este modelo experimental, es una característica que muchos autores atribuyen a las anomalías en el flujo placentario, (Eriksson y col 1984) infiriendo que un aumento en la superficie de intercambio compensaría la ineficiencia en el transporte bidireccional materno-fetal. (Georgiades y col 2002) Las patologías fetales y neonatales inducidas por la diabetes (retraso de

crecimiento fetal, hipoglucemia neonatal, distress respiratorio fetal, macrosomía) dependerán del grado de disfunción placentaria y de la severidad de la patología. (Teasdale y col 1981, Teasdale y col 1983) En las placentas de la mujeres diabéticas estudiadas en este trabajo de tesis se observaron varias de estas anomalías, indicando la alta frecuencia de dichas alteraciones.

En cuanto a la leptina, su alta producción placentaria y la presencia de su receptor en este tejido, sugieren efectos paracinos/autocinos de importancia. (Henson y col 2000) Entre ellos se destaca la regulación de la producción hormonal placentaria. (Cameo y col 2003) Asimismo, esta hormona tiene un rol muy importante en la regulación de la actividad de metaloproteasas, enzimas que actúan en la matriz extracelular, modificando la arquitectura tisular y regulando la invasión trofoblástica. (Castelluci y col 2000) Diversas patologías de la gestación cursan con una inadecuada producción de leptina placentaria. El retraso de crecimiento intrauterino y la pre-eclampsia, son alteraciones que frecuentemente se asocian entre sí, existiendo evidencia acerca de una relación entre ellas y ciertas alteraciones en la producción placentaria de leptina. (Sagawa y col 2002, Lea y col 2000, Sugden y col 2001) Existen estudios previos que muestran que los niveles de leptina se encuentran elevados en placentas a término de gestantes diabéticas bajo tratamiento insulínico. (Leperq y col 1998, Lea y col 2000) En efecto, se ha observado un efecto estimulador de la insulina sobre la producción trofoblástica de leptina. (Coya y col 2001)

En el modelo experimental de diabetes evaluado en este estudio hemos observado que los niveles de leptina placentarios están disminuidos, al igual que los niveles séricos y embrionarios. Los estudios inmunohistoquímicos no evidencian diferencias en cuanto a la localización, mostrando un patrón de expresión preferencial en la zona del laberinto trofoblástico, tanto en la placentas sanas como diabéticas. No hay antecedentes acerca de la identificación del tipo celular responsable de la síntesis de leptina en placenta de rata; sin embargo, en humanos está claramente descrito que los trofoblastos son productores de la hormona, y que la síntesis aumenta con la diferenciación de cito a sinciciotrofoblasto. En tal sentido, la inmadurez de las vellosidades que caracteriza a la placenta de gestantes diabéticas puede ser la causa de una producción disminuida de leptina. (Frendo y col 2000)

No se encontraron diferencias en cuanto a la cantidad o localización del receptor de leptina en cortes de placenta de rata control y diabética, en concordancia con los resultados de otros grupos que han estudiado dichos receptores en placenta de mujer sana y diabética. (Lea y col 2000)

Diferentes estudios sobre la producción de leptina durante la gesta diabética muestran resultados controvertidos. Se ha observado que en la diabetes moderada pre-gestacional y gestacional existe una disminución en los niveles circulantes de leptina. (Festa y col 1999, Abdelgair y col 2002) Sin embargo otros autores demuestran un aumento de la producción placentaria de la hormona en la gesta diabética. (Leperq y col 1998, Lea y col 2000) En el presente trabajo, se evaluó la producción de leptina en placentas a término de mujeres con diabetes gestacional y pregestacional observándose en ambos casos una disminución en los niveles de leptina placentaria. En tal sentido, y dado que un buen control metabólico resulta fundamental para moderar la inducción de las anomalías placentarias en la gesta diabética, (Bjork y col 1982) es probable que en aquellas mujeres donde el control metabólico sea adecuado, se favorezca la producción trofoblástica de leptina, y los niveles de leptina se eleven. Inversamente, ante la falta de control metabólico estricto, la respuesta trofoblástica se asemeja a aquella observada en la placenta del animal diabético sin tratamiento y con glucemias moderadamente elevadas, donde los niveles de leptina placentaria disminuyen.

La diabetes moderada en la rata, y la diabetes humana pre-gestacional y gestacional sin control metabólico estricto inducen una disminución en los niveles placentarios de leptina.

Es importante la función de NO como regulador del tono vascular, contribuyendo a la dilatación de la vasculatura placentaria y a la regulación del flujo sanguíneo útero-placentario (Myatt y col 1997, Rossmanith y col 1999, Syal y col 1999) Dados los antecedentes obtenidos en nuestro laboratorio acerca de las anomalías en los niveles de NO uterinos y embrionarios en los animales diabéticos, (Novaro y col 1998, Jawerbaum y col 1998 a, Jawerbaum y col 1998 b, Jawerbaum y col 1999) se estudió en este trabajo la producción de NO en placenta de rata sana y diabética. No hemos observado alteraciones en los niveles de NO ni en la actividad de su enzima de síntesis en el tejido placentario de rata diabética a término en relación al grupo control. Sin embargo, pudimos observar un aumento en la expresión de las isoformas iNOS y eNOS en placentas de ratas diabéticas en relación a los tejidos de rata control. Si bien generalmente la mayor expresión de isoformas NOS se acompañan de una mayor producción de NO, en presencia de estrés oxidativo, como aquel inducido por la diabetes, puede provocarse una rápida formación de peroxinitritos a partir de NO, o incluso un desacoplamiento de la enzima NOS, que induce la formación de peroxinitritos. (Bitar y col 2005) En nuestro laboratorio se ha observado que la placenta de rata diabética presenta una mayor nitrosilación proteica, evidenciando la presencia de

peroxinitritos y el daño tisular que éste induce. (Capobianco y col 2005) La presencia incrementada de enzima de síntesis de NO, sin evidencia de un aumento en su actividad y sin variación en los niveles de NO placentarios, podrían estar señalando que la diabetes induce el desacoplamiento de la NOS placentaria con la consiguiente formación de peroxinitritos, provocando de este modo daño tisular y una disminución del NO biodisponible.

Al estudiar el metabolismo nitridérgico en la placenta de mujeres con diabetes gestacional y pre-gestacional hemos observado en algunos casos un incremento en la producción de NO en relación a la placenta de mujeres sanas. La alta producción placentaria de NO en mujeres con diabetes pre-gestacional sugiere una correlación entre la sobreproducción de NO y la severidad de la patología, coincidiendo con aquellos antecedentes que señalan incrementos en las enzimas eNOS, iNOS y daño inducido por peroxinitritos en la placenta de mujeres diabéticas. (Schonfelder y col 1996, Rossmanith y col 1999) Si bien el NO tiene un efecto dilatador de la vasculatura placentaria, y por lo tanto se esperaría un efecto estimulador de la transferencia de nutrientes materno-fetal en presencia de mayores concentraciones de NO, se ha observado que existen en la placenta de mujeres diabéticas alteraciones en la respuesta vasodilatadora de NO, efecto que se cree vinculado al daño inducido por peroxinitritos en este tejido. (Myatt y col 2004)

La diabetes induce alteraciones en el metabolismo nitridérgico tanto en la placenta de rata a término como en la placenta de mujeres con diabetes gestacional y pre-gestacional.

La leptina modula la producción de NO y dependiendo del tejido, esta modulación será positiva, como ocurre en plasma, células de la granulosa, hipófisis y células del sistema inmune, o negativa en embriones en organogénesis temprana como se ha demostrado en este trabajo. (Frühbeck y col 2001 b, Huang y col 2005, Dixit y col 2003, Baratta y col 2002) Hemos estudiado la capacidad moduladora de la leptina sobre los niveles de NO en el tejido placentario a término de animales y pacientes sanos y diabéticos. En el tejido placentario de rata observamos que la leptina induce un aumento en la producción de NO tanto en el tejido sano como diabético. En forma semejante la leptina estimula la actividad NOS en la placenta de rata sana y diabética. Estos hallazgos estarían demostrando la capacidad de leptina de regular positivamente los niveles de NO placentarios, directamente vinculados con múltiples procesos de desarrollo y función de este órgano, como la dilatación de su vasculatura, (Farley y col 2004) la actividad de metaloproteasas,

enzimas que regulan la capacidad invasiva del trofoblasto, (Novaro y col 2001) y con procesos angiogénicos. (Murohara y col 1998, Reynolds y col 2001) Dado que estos efectos son dependientes de la concentración de hormona, su función como reguladora de los niveles de NO dependerá de los niveles endógenos de la misma.

En la placenta de mujeres sanas se observa un efecto regulador positivo de leptina sobre los niveles de NO, sin embargo dicho efecto no se evidencia en las placentas de pacientes diabéticas, lo que sugeriría que existen defectos en el mecanismo de acción de la leptina sobre la producción de NO en el tejido diabético. En este sentido, en nuestro laboratorio hemos observado que la acción de diferentes agentes vasoactivos se encuentra alterada cuando existe un alto grado de nitrosilación proteica. (Jawerbaum y col 2005 b)

La leptina regula positivamente los niveles de NO en la placenta de rata sana y diabética y en la placenta humana sana, evidenciándose alteraciones en este mecanismo regulatorio en las pacientes diabéticas.

La placenta cumple una función vital en la nutrición del feto. A través de este órgano transcurre el pasaje de los nutrientes a la circulación fetal para su utilización e incorporación al individuo en desarrollo. Si bien es importante la capacidad de síntesis de nutrientes por parte del feto, éste depende totalmente de la afluencia de muchos precursores provenientes de la madre. (Herrera y col 2000) En el metabolismo feto-placentario, los lípidos cumplen funciones constitutivas de nutrición y señalización, indispensables tanto para la función placentaria como para el desarrollo y crecimiento fetal. (Chartrel y col 1990) La transferencia lipídica hacia el feto, es regulada por la placenta y, aunque existe pasaje lateral de ácidos grasos, las macromoléculas como triglicéridos, colesterol, fosfolípidos y ésteres de colesterol deben sufrir un proceso de hidrólisis para ser incorporados a la placenta, donde son re-esterificados, utilizados, almacenados o liberados a la circulación fetal. (Herrera 2002, Hauguel de Mouzon y col 2001, Coleman y col 1984, Coleman y col 1987) Por lo expresado, el metabolismo lipídico placentario debe estar finamente regulado para asegurar una correcta funcionalidad y una adecuada transferencia lipídica, acorde al crecimiento y desarrollo fetal. (Herrera y col 2000)

El presente estudio muestra que en este modelo de diabetes moderada el tejido placentario de rata diabética no presenta alteraciones en los niveles de triglicéridos, ésteres de colesterol, fosfolípidos o colesterol en relación al control. Sí se observa, en cambio, una disminución en la capacidad de síntesis *de novo* de fosfolípidos y triglicéridos a partir de acetato, detectándose

asimismo un incremento en los productos de lipólisis, reflejando una elevada actividad catabólica sobre lípidos placentarios en los animales diabéticos. Dadas las alteraciones del metabolismo lipídico materno inducidas por la diabetes, (Freinkel y col 1980, Herrera y col 1987, Leturque y col 1989) es probable que las alteraciones metabólicas observadas ocurran en respuesta a una mayor transferencia de lípidos maternos hacia la placenta. Cabe destacar, que si bien una menor síntesis lipídica en este tejido evitaría la acumulación de lípidos placentaria y en consecuencia el pasaje de lípidos al feto en desarrollo, la estimulación del catabolismo placentario probablemente conduzca a una excesiva transferencia de ácidos grasos libres al feto en desarrollo.

La diabetes materna induce anomalías en el metabolismo lipídico placentario, evidenciadas por una menor capacidad de síntesis de novo y una mayor actividad catabólica, alteraciones que probablemente sean el resultado de una mayor oferta de lípidos desde la circulación materna, y tiendan a mantener el adecuado nivel de lípidos en la placenta.

La leptina modula el metabolismo lipídico de adipocitos, aumentando el catabolismo. (Frühbeck y col 2002) En el músculo y en cultivos de islotes pancreáticos, la leptina disminuye la incorporación de ácidos grasos a triglicéridos y aumenta la oxidación de los mismos a CO₂. (Muoio y col 1999, Shimabukuro y col 1997) Dado entonces el importante rol de leptina en el metabolismo lipídico y la gran cantidad de leptina que produce la placenta, resultó de interés la evaluación de la hormona como modulador del metabolismo lipídico placentario. Para ello, determinamos el efecto de adiciones de leptina sobre los niveles de lípidos, su síntesis y su catabolismo en la placenta de rata y humana.

En placenta de rata sana se observa claramente que la leptina regula negativamente la producción de ésteres de colesterol, triglicéridos, colesterol y fosfolípidos placentarios. Este efecto lipolítico parece ser el resultado de un catabolismo lipídico incrementado, ya que la liberación de glicerol al medio de incubación es mayor en presencia de leptina pero ésta no modifica la síntesis *de novo* de ninguna de las especies lipídicas analizadas.

En la placenta de rata diabética se observan también los efectos lipolíticos de la leptina exógena. Dado que la diabetes incrementa el catabolismo lipídico placentario, y la leptina posee en este tejido efectos catabólicos, quizás la disminución de sus niveles sea un mecanismo regulatorio

tendiente a evitar una mayor degradación y consiguiente incremento en el pasaje de lípidos al feto en desarrollo.

Frühbeck y col en 2001, establecieron que en adipocitos, el NO se halla implicado en los efectos lipolíticos de la leptina administrada *in vivo* e *in vitro* sobre adipocitos. Sin embargo, en el tejido placentario, el NO no parece mediar los efectos estimulatorios de leptina sobre el catabolismo lipídico o la acción de leptina sobre los niveles lipídicos. La inhibición de la NOS, así como el agregado exógeno de NO no alteran los niveles de las especies lipídicas evaluadas ni la producción de glicerol en placenta de rata. En forma diferente, la inhibición de la NOS produce una clara disminución de la síntesis lipídica *de novo* a partir de acetato, aunque el agregado de NO exógeno no mostró efecto alguno sobre este parámetro, indicando que este mecanismo no sería directo, y quizás se vincule con la acción de otros agentes, como la prostaglandina 15deoxydelta¹²⁻¹⁴PGJ₂, que actúa inhibiendo la producción de NO y la síntesis de lípidos en este tejido. (Capobianco y col 2005)

La leptina es un modulador negativo del metabolismo lipídico, reduciendo los niveles de lípidos placentarios, mecanismo que parece deberse a su efecto catabólico y no a regulaciones sobre la síntesis lipídica de novo. El NO no estaría involucrado en los efectos lipolíticos de la leptina. La diabetes induce anomalías en el metabolismo lipídico placentario, observándose un mayor catabolismo y menor síntesis de lípidos. En la placenta de rata diabética se evidencian los efectos catabólicos de leptina, y sus bajos niveles quizás eviten que su estímulo lipolítico se sume a aquél inducido por la hipoinsulinemia. Esto minimizaría un impacto adverso sobre los mecanismos de transferencia de lípidos al feto en desarrollo.

Estudios realizados en mujeres durante la gestación muestran que los niveles de leptina en sangre de cordón umbilical estarían correlacionados con peso al nacer y con la circunferencia craneal. (Ong y col 1999) Más aún, hay autores que observaron una correlación entre los niveles de leptina en cordón y la ocurrencia de la macrosomía. (Wiznitzer y col 2000) Se han relacionado los niveles de leptina del lado materno con el cociente entre el peso fetal y el placentario sugiriéndose que la leptina materna estaría direccionando la provisión de lípidos al feto en desarrollo. (Hoggard y col 2001) Sin embargo, la participación directa de leptina en el metabolismo lipídico feto-placentario no ha sido previamente evaluada.

En forma interesante, nuestros estudios realizados en tejido placentario de mujeres a término muestran que la leptina es también en este caso un regulador del metabolismo lipídico, induciendo una disminución en los niveles de triglicéridos y ésteres de colesterol. Al igual que en la placenta de rata, ante el agregado de leptina no se observan modificaciones de la síntesis *de novo* en ninguna de las especies lipídicas evaluadas. Nuevamente, la leptina parece tener un claro efecto catabólico, observándose incrementos en la liberación de glicerol, índice de la degradación lipídica. Estos resultados coinciden con observaciones previas que describen un incremento en la producción de glicerol como índice del efecto lipolítico de la leptina en células de tejido adiposo. (Frühbeck y col 2001b, Frühbeck y col 2002)

Los trofoblastos son el tipo celular en la placenta vinculado en forma directa con la transferencia de nutrientes al feto en desarrollo. En la placenta humana, una capa de sinciotrofoblastos separan la circulación fetal de la sangre materna. El cultivo primario de trofoblastos ha sido frecuentemente utilizado para el estudio de los efectos de leptina sobre la placenta humana. (Cameo y col 2003, Islami y col 2003) A fin de evaluar el efecto de leptina sobre el catabolismo lipídico de trofoblastos, se realizó un cultivo primario de 72 hs. y se le adicionó leptina en distintas concentraciones. Se pudo observar que la hormona produce un aumento dosis dependiente en el catabolismo lipídico de trofoblastos aislados en cultivo. Estas observaciones confirman el efecto lipolítico de la leptina sobre el tejido placentario, y particularmente sobre el área específica de intercambio materno-fetal.

La leptina posee efectos lipolíticos en tejido placentario humano. La adición de leptina disminuye los niveles de lípidos e incrementa su catabolismo sin afectar la síntesis lipídica de novo. El efecto catabólico de leptina se evidencia asimismo en cultivos de trofoblastos aislados.

Conclusiones

En este estudio hemos evaluado alteraciones placentarias y embrionarias que se inducen en la preñez diabética. En particular nos interesó el efecto de la diabetes moderada sobre la organogénesis temprana y la preñez a término. La importancia del período de organogénesis temprana radica en la mayor susceptibilidad del embrión a la inducción de malformaciones, en esta etapa, en la cual el entorno anómalo puede afectar a los órganos en formación y generar daño severo y permanente. En la preñez a término es importante el estudio de la placenta, órgano transiente que suministra al feto los nutrientes necesarios para su desarrollo y crecimiento, ya que las anomalías metabólicas del entorno materno afectan a la placenta e indirectamente al feto.

Como objetivos, hemos intentado esclarecer funciones autócrinas/parácrinas de leptina en el desarrollo embrionario y en la función placentaria. Asimismo, estudiando los embriones y la placenta proveniente de ratas con diabetes moderada y la placenta de pacientes diabéticos, hemos tratado de identificar alteraciones en la producción de leptina y en sus efectos que permitan evaluar una posible influencia de la hormona en la dismorfogénesis embrionaria y en las anomalías del metabolismo nitridérgico y lipídico embrionario y placentario inducidas por la diabetes.

En cuanto al desarrollo embrionario, se observó que los embriones provenientes de rata diabética presentan malformaciones de tubo neural, cardíacas, de rotación axial y retraso del crecimiento. Estas anomalías también se evidencian cuando los embriones de rata control son cultivados en presencia de un entorno anómalo como es el suero de rata diabética, y en presencia de elevadas concentraciones de leptina. En los embriones de rata diabética los niveles de leptina están disminuidos. Es probable que los niveles de leptina embrionarios deban estar finamente regulados y en acotadas concentraciones para el normal desarrollo del embrión.

En el desarrollo embrionario es importante y fundamental el rol del metabolismo lipídico, dada la importancia de los lípidos como constituyentes de las membranas celulares en formación y como molécula señal. La hiperglucemia materna produce una alteración en el metabolismo lipídico embrionario en este modelo experimental de diabetes, particularmente en la síntesis *de novo*. En este estudio se ha puesto en relieve la capacidad de leptina para inducir una

disminución en los niveles de lípidos embrionarios, efecto que se evidencia en los embriones de rata diabética durante la organogénesis temprana, en los que podría estar compensando con un mayor catabolismo la mayor transferencia de lípidos maternos, quizás previniendo una acumulación excesiva de lípidos en el embrión.

Los niveles de NO, importante morfógeno durante el desarrollo embrionario, se encuentran elevados en el embrión de rata diabética, mecanismo asociado a la inducción de anomalías morfológicas embrionarias. En este estudio se pudo determinar que la leptina es un modulador negativo de los niveles de NO tanto en los embriones de rata control como de rata diabética. De esta forma los bajos niveles de leptina en el embrión de madre diabética estarían contribuyendo al aumento en los niveles embrionarios de NO, y quizás, a través de este mecanismo, a la aparición de malformaciones congénitas en esta patología.

La placenta es el órgano que media entre la madre y el feto en desarrollo. Una vez establecida la nutrición hemotrófica, es de particular importancia en el suministro de nutrientes, oxígeno, agua y otras sustancias. En la madre diabética se producen anomalías metabólicas que se transfieren a través de la sangre materna al feto en desarrollo, a las cuales se suman las propias alteraciones morfológicas y funcionales de la placenta, que afectan la adecuada transferencia materno-fetal. En el modelo de diabetes estudiado, pudimos observar que la placenta diabética presenta un aumento de peso, probablemente debido a un aumento de la proliferación de las vellosidades tendiente a aumentar la superficie de intercambio para compensar probables deficiencias en la transferencia feto-placentaria.

La diabetes induce anomalías en la producción de leptina, cuyos niveles aumentan de manera importante durante la preñez debido a la gran producción placentaria. En este estudio observamos que los niveles plasmáticos de la hormona se encuentran disminuidos en las ratas preñadas diabéticas con relación al control. Más aún, también encontramos disminuidos los niveles placentarios de leptina en la mujer diabética. En cuanto a su localización, se reveló una mayor expresión en la zona del laberinto, especializada en el intercambio materno fetal, detectándose en la placenta de rata diabética menores niveles placentarios de leptina en esta zona. De esta forma, hemos evidenciado que la diabetes induce una disminución en los niveles plasmáticos y en la producción placentaria de leptina sin producir alteraciones en su localización tisular.

El metabolismo lipídico placentario cobra especial relevancia debido a que de éste depende tanto la función placentaria como la transferencia de lípidos al feto en desarrollo. En el modelo de diabetes evaluado, determinamos que en la placenta de rata diabética los niveles de lípidos no se encuentran alterados con respecto al tejido control. Sin embargo la capacidad de síntesis está disminuida y la actividad catabólica está incrementada en la placenta de animales diabéticos. Inferimos que los trastornos en el metabolismo lipídico materno causan una afluencia incrementada de lípidos que es compensada a nivel placentario por una disminución de la síntesis *de novo* y un aumento del catabolismo lipídico

En este trabajo, se describe por primera vez la acción de leptina sobre el metabolismo lipídico en la placenta de rata y humana. Los niveles de lípidos son disminuidos y el catabolismo lipídico estimulado por la leptina, sin afectar la síntesis *de novo* de lípidos. De esta forma se considera que la leptina sería un importante regulador de la degradación lipídica en el tejido placentario, evento que condiciona en forma directa el pasaje de lípidos al feto en desarrollo.

Dada la importante vinculación entre la diabetes materna, la regulación de los niveles de leptina, y los efectos catabólicos de la hormona en el tejido placentario, es probable que la baja producción de leptina evite un incremento aún mayor en el ritmo catabólico que origina una constante degradación de lípidos en el tejido placentario de la gestante diabética. Este mecanismo compensatorio podría evitar la sobreoferta de lípidos que en este caso afecta el desarrollo fetal.

En la placenta, el NO modula el tono vascular, regulando de esta manera el flujo sanguíneo placentario y la transferencia bilateral materno-fetal. Nuestros resultados muestran que la expresión de las isoformas iNOS y eNOS están incrementadas en la placenta de rata diabética en relación al control, pero, sin embargo, este aumento no se refleja en los niveles de NO o en la actividad NOS evaluada. Dado que el estrés oxidativo causado por la diabetes es capaz de desacoplar la NOS, lo que la hace producir radicales peroxinitritos en lugar de NO, podemos inferir que la diabetes induce un aumento en la expresión de iNOS y eNOS, pero a la vez provoca un desacoplamiento de estas isoenzimas y no se traduce en mayor producción NO.

Con respecto a la modulación de los niveles de NO en la placenta, hemos determinado que la leptina es un regulador positivo de la producción de NO, tanto con respecto a la actividad NOS como a los niveles de NO placentarios. Este hecho nos permite inferir que la leptina

contribuye a la producción placentaria de NO y, a través de ella a la dilatación vascular, a la regulación del flujo sanguíneo y a la transferencia bidireccional de sustancias.

Dado que en la patología diabética los niveles de leptina placentarios están disminuidos, y que, al igual que en la placenta sana, la leptina regula positivamente la producción de NO, es probable que los bajos niveles de leptina en el tejido diabético contribuyan a evitar un aumento en la producción de NO, que ante la excesiva presencia de especies reactivas de oxígeno inducidas por la diabetes daría lugar a la formación de peroxinitritos y su consecuente daño tisular.

En forma importante, y ante los hallazgos observados en cuanto a los niveles y función de leptina en placenta de rata sana y diabética, hemos evaluado en este trabajo los niveles de leptina y su función en placenta a término de mujeres sanas, con diabetes pre-gestacional y con diabetes gestacional.

Observamos una disminución en el contenido de leptina en placentas de pacientes diabéticas gestacionales y una disminución aún más marcada en placentas de pacientes diabéticas pre-gestacionales. De estos resultados inferimos que los niveles placentarios de leptina disminuyen en la patología diabética en relación directa con la severidad de la patología.

Inversamente a lo observado al evaluar los niveles de leptina, hemos determinado que la producción de NO está incrementada en las placentas de las mujeres diabéticas, siendo este incremento más significativo en el caso de las diabéticas pre-gestacionales. De esta forma, el aumento en la producción de NO placentario también estaría directamente relacionado con la severidad de la patología. En este caso, no sólo los niveles sino también los mecanismos regulatorios de la producción de NO están afectados por la diabetes ya que la leptina modula positivamente los niveles de NO en la placenta de mujeres sanas y no así en la placenta de mujeres con diabetes pre-gestacional y gestacional. Estas alteraciones en los niveles y regulación de NO probablemente estén involucradas en las anomalías en el flujo sanguíneo placentario y en la transferencia materno-fetal inducidas por la patología diabética.

En este trabajo comprobamos que en la placenta humana, la leptina modula el metabolismo lipídico, regulando negativamente los niveles de lípidos, mecanismo que sería el resultado de un efecto directo sobre el catabolismo lipídico. En forma interesante, estudios realizados en cultivos primarios de trofoblastos humanos nos han permitido establecer que el

efecto estimulador sobre el catabolismo lipídico se manifiesta en las células trofoblásticas, es decir, en la zona específica de intercambio entre la sangre materna y la fetal.

Finalmente, podemos concluir que la leptina posee un importante rol regulador del metabolismo nitridérgico y lipídico en el embrión y la placenta. La patología diabética materna afecta la producción de leptina embrionaria y placentaria, condicionando la producción de NO y el metabolismo de lípidos, procesos afectados por la diabetes y que determinan la presencia de anomalías embrionarias y de alteraciones en el desarrollo placentario y fetal.

Referencias

Abdelgair M, Elbagir M, Eltom M, Berne C, Ahren B (2002) "Reduced leptin concentrations in subjects with type 2 diabetes mellitus in Sudan" *Metabolism* 51 (3): 304-6.

Adler RR, Ng AK, Rote NS (1995) "Monoclonal antiphosphatidylserine antibody inhibits intercellular fusion of the choriocarcinoma line JAR" *Biology of Reproduction* 53 (4): 905-10.

Aerts L, Van Assche FA (2003) "Intra-uterine transmission of disease" *Placenta* 24 (10): 905-11.

Aitken MA, Farrugia W, Wong MH, Scott KF, Brenneke SP, Rice GE (1993) "Type II phospholipase A2 in human gestational tissues: extractable immuno and enzymatic activity in fetal membranes" *Biochemica et Biophysica Acta* 1170 (3): 314-20.

Albrecht ED, Pepe GJ.(1990) "Placental steroid hormone biosynthesis in primate pregnancy" *Endocrinology Reviews* 11 (1): 124-50.

Alexander, B (1998) "The role of nitric oxide in hepatic metabolism" *Nutrition* 14 (4): 376-90

Alsat E, Malassine A (1984) "High density lipoprotein interaction with human placenta: biochemical and ultrastructural characterization of binding to microvillous receptor and lack of internalization" *Molecular and Cellular Endocrinology* 77 (1-3): 97-108.

Amico JA, Thomas A, Crowley RS, Burmeister LA "Concentrations of leptin in the serum of pregnant, lactating, and cycling rats and of leptin messenger ribonucleic acid in rat placental tissue" (1998) *Life Science* 63 (16): 1387-95

Antczak M, Van Blerkom J (1997) "Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and human oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation stage embryo" *Molecular Human Reproduction*. 3 (12): 1067-86.

Arnaiz SL, D'Amico G, Paglia N, Arismendi M, Basso N, del Rosario Lores Arnaiz M (2004) "Enriched environment, nitric oxide production and synaptic plasticity prevent the aging-dependent impairment of spatial cognition" *Molecular Aspects of Medicine* 25 (1-2): 91-101.

Arner P, Pollare T, Lithell H (1991) "Different aetiologies of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus in obese and non-obese subjects" *Diabetologia* 34 (7): 483-7.

Arnhold S, Fassbender A, Klinz FJ, Kruttwig K, Lohnig B, Andressen C, Addicks K (2002) "NOS-II is involved in early differentiation of murine cortical, retinal and ES-cell derived neurons-an immunocytochemical and functional approach" *International Journal of Developmental Neuroscience* 20 (2): 83-92.

Atanassova P, Popova L (2000) "Leptin expression during the differentiation of subcutaneous adipose cells of human embryos in situ." *Cells Tissues and Organs* 166 (1): 15-9.

Banerjee S, Ghosh US, Banerjee D (2004) "Effect of tight glycaemic control on fetal complications in diabetic pregnancies" *Journal of the Associated Physicians India* 52: 109-13.

Banks WA, Kastin AJ, Huang W, Jaspan JB, Maness LM (1996) "Leptin enters the brain by a saturable system independent of insulin" *Peptides* 17 (2): 305-11.

Barash V, Riskin A, Shafir E, Waddell ID, Burchell A (1991) "Kinetic and immunologic evidence for the absence of glucose-6-phosphatase in early human chorionic villi and term placenta" *Biochimica et Biophysica Acta* 1073 (1): 161-7.

Baratta M, Saleri R, Mainardi GL, Valle D, Giustina A, Tamanini C (2002) "Leptin regulates GH gene expression and secretion and nitric oxide production in pig pituitary cells" *Endocrinology* 143 (2): 551-7.

Barros LF, Yudilevich DL, Jarvis SM, Beaumont N, Baldwin SA (1995) "Quantitation and immunolocalization of glucose transporters in the human placenta" *Placenta* 16 (7): 623-33.

Bates SH, Stearns WH, Dundon TA, Schubert M, Tso AW, Wang Y, Banks AS, Lavery HJ, Haq AK, Maratos-Flier E, Neel BG, Schwartz M, Myers MG Jr (2003) "STAT3 signalling is required for leptin regulation of energy balance but not reproduction" *Nature* 421 (6925): 856-9.

Baumann MU, Deborde S, Illsley NP (2002) "Placental glucose transfer and fetal growth." *Endocrine* 19 (1):13-22.

Belleville F, Lasbennes A, Nabet P, Paysant P (1979) "HCS regulation in cultured placenta: action of glucose" *Acta of Endocrinology (Copenhagen)* 92 (2): 336-46.

Beltowski J, Jochem J, Wojcicka G, Zwirska-Korczala K (2004) "Influence of intravenously administered leptin on nitric oxide production, renal hemodynamics and renal function in the rat" *Regulation Peptide* 120 (1-3): 59-67.

Benoit H, Jordan M, Wagner H, Wagner PD (1999) "Effect of NO, vasodilator prostaglandins, and adenosine on skeletal muscle angiogenic growth factor gene expression" *Journal of Applied Physiology* 86 (5): 1513-8.

Bisseling TM, Wouterse AC, Steegers EA, Elving L, Russel FG, Smits P (2003) "Nitric oxide-mediated vascular tone in the fetal placental circulation of patients with type 1 diabetes mellitus" *Placenta* 24 (10): 974-8

Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS, Al-Mulla F (2005) "Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes" *European Journal of Pharmacology* 511 (1): 53-64

Bjork O, Persson B (1982) "Placental changes in relation to the degree of metabolic control in diabetes mellitus" *Placenta* 3 (4): 367-78.

Bjork O, Persson B (1984) "Villous structure in different parts of the cotyledon in placentas of insulin-dependent diabetic women. A morphometric study" *Acta of Obstetrics and Gynecology Scandinavia* 63 (1): 37-43.

Blight EG, Dyer WJ (1959) "A rapid method of total lipid extraction and purification" *Canada Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911-7.

Bloch W, Fleischmann BK, Lorke DE, Andressen C, Hops B, Hescheler J, Addicks K (1999) "Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis" *Cardiovascular Research* 43: 675-684

Bonadonna RC, De Fronzo RA (1991) "Glucose metabolism in obesity and type 2 diabetes" *Diabetes Metabolism* 17 (1 Pt 2): 112-35.

Bonnefont-Rousselot D (2002) "Glucose and reactive oxygen species" *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolism Care* 5 (5): 561-8.

Borowiec M, Wasilewska-Dziubinska E, Chmielowska M, Wolinska-Witort E, Baranowska B (2002) "Effects of leptin and neuropeptide Y (NPY) on hormones release in female rats" *Neuronal Endocrinology Letters* 23 (2): 149-54.

Boucher A, Lu D, Burgess SC, Telemaque-Potts S, Jensen MV, Mulder H, Wang MY, Unger RH, Sherry AD, Newgard CB (2004) "Biochemical mechanism of lipid-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion and reversal with a malate analogue" *Journal of Biological Chemistry* 279 (26): 27263-71.

Bradford MM (1976) "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding" *Analytical Biochemistry* 72: 248-54.

Brandes R, Arad R, Barash V. (1987) "Cytosolic fatty acid binding proteins in rat placenta" *Placenta* 8 (4): 347-50.

Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG, Sorenson RL (1993) "Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy" *Endocrinology* 132 (2): 879-87.

Brewer LM, Sheardown SA, Brown NA (1993) "HMG-CoA reductase mRNA in the post-implantation rat embryo studied by in situ hybridization" *Teratology* 47 (2): 137-46.

Brillon DJ, Freidenberg GR, Henry RR, Olefsky JM (1989) "Mechanism of defective insulin-receptor kinase activity in NIDDM. Evidence for two receptor populations" *Diabetes* 38 (3): 397-403.

Buchanan T, Freinkel N, Lewis NJ, Metzger BE, Akazawa S (1985) "Fuel-mediated teratogenesis. Use of D-mannose to modify organogenesis in the rat embryo in vivo" *Journal of Clinical Investigation* 75 (6): 1927-34.

Buchanan TA (1991) "Glucose metabolism during pregnancy: normal physiology and implications for diabetes mellitus" *Israel Journal of Medical Sciences* 27 (8-9): 432-41.

Buhimschi I, Ali M, Jain V, Chwalisz K, Garfield RE (1996) "Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour" *Human Reproduction* 11 (8): 1755-66.

Burnett TG, Tash JS, Hunt JS (2002) "Investigation of the role of nitric oxide synthase 2 in pregnancy using mutant mice" *Reproduction* 124 (1): 49-57.

Calvillan M, Durruty P, Lopez G, Rocha G (1991) "Insulin sensitivity in vivo: evaluation of non insulin dependent diabetes mellitus patients and healthy subjects by euglycemic hyperinsulinemic clamp" *Revista Médica de Chile* 119 (10): 1101-8.

Cameo P, Bischof P, Calvo JC (2003) "Effect of leptin on progesterone, human chorionic gonadotropin, and interleukin-6 secretion by human term trophoblast cells in culture" *Biology of Reproduction* 68: 472-477.

Campbell FM, Gordon MJ, Dutta-Roy AK (1996) "Preferential uptake of long chain polyunsaturated fatty acids by isolated human placental membranes" *Molecular Cellular Biochemistry* 155 (1): 77-83..

Camus-Bablon F, Cohen RM, Berk MA, Perisutti G, Hunter K, Frohman LA (1990) "Alterations in circulating human chorionic gonadotropin free alpha-subunit in insulin-dependent diabetic pregnancy: correlation with maternal characteristics" *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 71 (1): 46-52.

Capobianco E, Jawerbaum A, Romanini MC, White V, Pustovrh C, Higa R, Martinez N, Mugnaini MT, Soñez C and Gonzalez E (2005) "15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ and

peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) levels in term placental tissues from control and diabetic rats: modulatory effects of a PPAR γ agonist on nitridergic and lipid placental metabolism” *Reproduction Fertility & Development* 17: 423-33.

Castellucci M, De Matteis R, Meisser A, Canello R, Monsurró V, Islami D, Sarzani R, Marzioni D, Cinti S, Bischof P (2000) “Leptin modulates extracellular matrix molecules and metalloproteinases: possible implications for trophoblast invasion” *Molecular Human Reproduction* 6 (10): 951-8.

Castracane VD, Hendrickx AG, Henson MC (2005) “Serum leptin in nonpregnant and pregnant women and in old and new world nonhuman primates” *Experimental Biology and Medicine* 230 (4): 251-4

Ceddia RB, William WN Jr., Lima FB, Carpinelli AR, Curi R (1998) “Pivotal role of leptin in insulin effects” *Brazilian Journal of Medical and Biology Research* 31 (6): 715-22.

Challier J, Galtier M, Bintein T, Cortez A, Leperq J, Hauguel de Mouzon S (2003) “Placental leptin receptor isoforms in normal and pathological pregnancies” *Placenta* 24 (1): 92-9

Chardonens D, Cameo P, Aubert ML, Pralong FP, Islami D, Campana A, Gaillard RC, Bischof P (1999) “Modulation of human cytotrophoblastic leptin secretion by interleukin-1 α y 17 β -estradiol and its effect on hCG secretion” *Molecular Human Reproduction* 5 (11): 1077-82.

Chartrel NC, Clabaut MT, Boismare FA, Schrub JC (1990) “Uteroplacental hemodynamic disturbances in establishment of fetal growth retardation in streptozocin-induced diabetic rats” *Diabetes* 39 (6): 743-6.

- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ (2001) "Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files" *Science* 294 (5548):1866-70.
- Chen NG, Swick AG, Romsos DR (1997) "Leptin constrains acetylcholine-induced insulin secretion from pancreatic islets of ob/ob mice" *Journal of Clinical Investigation* 100 (5): 1174-9.
- Chi MM, Hoehn A, Moley KH (2002) "Metabolic changes in the glucose-induced apoptotic blastocyst suggest alterations in mitochondrial physiology" *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 283 (2): E226-32.
- Coleman DL, Hummel KP (1969) "Effects of parabiosis of normal with genetically diabetic mice" *American Journal of Physiology* 217 (5): 1298-304.
- Coleman RA, Haynes EB (1984) "Microsomal and lysosomal enzymes of triacylglycerol metabolism in rat placenta" *Biochemical Journal* 217 (2): 391-7
- Coleman RA, Haynes EB (1987) "Synthesis and release of fatty acids by human trophoblast cells in culture" *Journal of Lipid Research* 28 (11): 1335-41.
- Comi RJ, Grunberger G, Gorden P "Relationship of insulin binding and insulin-stimulated tyrosine kinase activity is altered in type II diabetes" *Journal of Clinical Investigation* (1987) 79 (2): 453-62.
- Comperolle V, Brusselmans K, Franco D, Moorman A, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P (2003) "Cardia bifida, defective heart development and abnormal neural crest migration in embryos lacking hypoxia-inducible factor-1alpha" *Cardiovascular Research* 60 (3): 569-79.
- Corbett JA, Mc Daniel ML (1992) "Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of beta-cells? Possible therapeutic interventions in IDDM" *Diabetes* 41 (8): 897-903.

Coya R, Gualillo O, Pineda J, García M. C, Busturia M. A, Aniel-Quiroga A, Martul P, Señarís M R (2001) "Effect of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate, glucocorticoids, and insulin on leptin messenger RNA levels and leptin secretion in cultured human trophoblast" *Biology of Reproduction* 65: 814-819.

Cusin I, Sainsbury A, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B (1995) "The ob gene and insulin. A relationship leading to clues to the understanding of obesity" *Diabetes* 44 (12): 1467-70.

Cummings SW, Hatley W, Simpson ER, Ohashi M (1982) "The binding of high and low density lipoproteins to human placental membrane fractions" *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 54 (5): 903-8

Das T, Sa G, Mukherjea M (1988) "Purification and characterization of fatty acid-binding protein from human placenta" *Lipids* 23 (6):528-33

Das T, Sa G, Mukherjea M (1993) "Characterization of cardiac fatty-acid-binding protein from human placenta. Comparison with placenta hepatic types" *European Journal of Biochememistry* 211 (3): 725-30.

Demers LM, Gabbe SG, Vilee CA, Greep RO (1973) "Human chorionic gonadotropin-mediated glycogenolysis in human placental villi: a role of prostaglandins" *Biochemica et Biophysica Acta* 313 (1): 202-10.

Desoye G, Schweditsch MO, Pfeiffer KP, Zechner R, Kostner GM (1987) "Correlation of hormones with lipid and lipoprotein levels during normal pregnancy and postpartum" *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 64 (4): 704-12

Desoye G, Hofmann HH, Weiss PA (1992) "Insulin binding to trophoblast plasma membranes and placental glycogen content in well-controlled gestational diabetic women treated with diet or insulin, in well-controlled overt diabetic patients and in healthy control subjects" *Diabetologia* 35 (1): 45-55.

Desoye G, Hartmann M, Blaschitz A, Dohr G, Hahn T, Kohnen G, Kaufmann P (1994) "Insulin receptors in syncytiotrophoblast and fetal endothelium of human placenta. Immunohistochemical evidence for developmental changes in distribution pattern." *Histochemistry* 101 (4): 277-85

Diamant YZ, Mayorek N, Neumann S, Shafrir E (1975 a) "Enzymes of glucose and fatty acid metabolism in early and term human placenta." *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 121 (1): 58-61.

Diamant YZ, Neuman S, Shafrir E (1975 b) "Effect of chorionic gonadotropin, triamcinolone, progesterone and estrogen on enzymes of placenta and liver in rats" *Biochemica et Biophysica Acta* 385 (2): 257-67

Diamant YZ, Shafrir E (1978) "Placental enzymes of glycolysis, gluconeogenesis and lipogenesis in the diabetic rat and in starvation. Comparison with maternal and foetal liver" *Diabetologia* 15 (6): 481-5.

Diamant YZ, Diamant S, Freinkel N (1980) "Lipid deposition and metabolism in rat placenta during gestation" *Placenta* 1 (4): 319-25

Dixit VD, Mielenz M, Taub DD, Parvizi N (2003) "Leptin induces growth hormone secretion from peripheral blood mononuclear cells via a protein kinase C- and nitric oxide-dependent mechanism" *Endocrinology* 144 (12): 5595-603.

Docherty SM, Iles RK, Wathen N, Chard T (1996) "The temporary anatomical structures prominent in the first trimester may be fulfilling exchange functions assigned to the placenta in the second and third trimester" *Human Reproduction* 11(6):1157-61

Dunne F, Brydon P, Smith K, Gee H (2003) "Pregnancy in women with Type 2 diabetes: 12 years outcome data 1990-2002" *Diabetic Medicine* 20 (9): 734-8.

Ebenbichler CF, Kaser S, Laimer M, Wolf HJ, Patsch JR, Illsley NP (2002) "Polar expression and phosphorylation of human leptin receptor isoforms in paired, syncityal, microvillous and basal membranes from human term placenta" *Placenta* 23: 516-21.

Efendic S, Luft R, Wajngot A (1984) "Aspects of the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews* 5 (3): 395-410.

Efendic S, Wajngot A, Vranic M (1985) "Increased activity of the glucose cycle in the liver: early characteristic of type 2 diabetes" *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82 (9): 2965-9.

Eizirik DL, Mandrup-Poulsen T (2001) "A choice of death: the signal transduction of immune-mediated-cell apoptosis" *Diabetologia* 44: 2115–2133.

Erickson JC, Hollopeter G, Palmiter RD (1996a) "Attenuation of the obesity syndrome of ob/ob mice by the loss of neuropeptide Y" *Science* 274 (5293): 1704-7.

Erickson JC, Clegg KE, Palmiter RD (1996 b) "Sensitivity to leptin and susceptibility to seizures of mice lacking neuropeptide Y" *Nature* 381 (6581): 415-21

Eriksson UJ, Jansson L (1984) "Diabetes in pregnancy: decreased placental blood flow and disturbed fetal development in the rat" *Pediatric Research* 18 (8): 735-8.

Eriksson UJ, Siman CM (1996) "Pregnant diabetic rats fed the antioxidant butylated hydroxytoluene show decreased occurrence of malformations in offspring." *Diabetes* 45 (11): 1497-502.

Eriksson UJ, Cederberg J, Wentzel P (2003) "Congenital malformations in offspring of diabetic mothers--animal and human studies" *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 4 (1): 79-93.

Evers IM, de Valk HW, Visser GH (2004) "Risk of complications of pregnancy in women with type 1 diabetes: nationwide prospective study in the Netherlands" *British Medical Journal* 328 (7445): 915.

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" *Journal of Lipid Research* 37 (2): 347-60.

Farese RV, Herz J (1998) "Cholesterol metabolism and embryogenesis" *Trends in Genetics* 14 (3): 115-20

Farley AE, Graham CH, Smith GN (2004) "Contractile properties of human placental anchoring villi" *American Journal of Physiology* 287 (3): R680-5.

Fehman HC, Bode HP, Ebert T, Karl A, Goke B (1997) "Interaction of GLP-1 and leptin at rat pancreatic B-cells: effects on insulin secretion and signal transduction." *Hormone Metabolism and Research*. 29(11): 572-6.

Feingold KR, Wiley T, Moser AH, Lear SR, Wiley MH (1983) "De novo cholesterologenesis in pregnancy" *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 101 (2): 256-63

Ferguson EM, Leese HJ (1999) "Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos." *Journal of Reproduction and Fertility* 116 (2): 373-8.

Fernandez Celadilla L, Carbajo Rueda M, Muñoz Rodriguez M (2005) "Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in pregnant rats: effects on blood pressure, fetal growth and litter size" *Archives of Gynecology and Obstetrics* 271 (3): 243-8.

Festa A, Shnawa N, Krugluger W, Hopmeier P, Schernthaner G, Haffner SM (1999) "Relative hypoleptinaemia in women with mild gestational diabetes mellitus" *Diabetic Medicine* 16 (8): 656-62.

Fine EL, Horal M, Chang TI, Fortin G, Loeken MR (1999) "Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy" *Diabetes* 48 (12): 2454-62.

Fisher MC, Zeisel SH, Mar MH, Sadler TW (2001) "Inhibitors of choline uptake and metabolism cause developmental abnormalities in neurulating mouse embryos" *Teratology* 64 (2): 114-22.

Frank HG, Morrish DW, in cooperation with Pötgens A, Genbacev B, Kumpel B, Caniggia I (2001) "Cell culture models of human trophoblast –A workshop report" *Placenta* 22 Supplement A: S107-9.

Freeman SJ, Brown NA (1994) "Inhibition of yolk sac function in late gastrulation rat conceptuses as a cause of teratogenesis: an in vivo/in vitro study." *Reproductive Toxicology* 8 (2): 137-43.

Freinkel N (1980) "Of pregnancy and progeny" *Diabetes* 29 (12): 1023-35.

Freinkel N, Metzger BE, Phelps RL, Dooley SL, Ogata ES, Radvany RM, Belton A (1985) "Gestational diabetes mellitus. Heterogeneity of maternal age, weight, insulin secretion, HLA antigens, and islet cell antibodies and the impact of maternal metabolism on pancreatic B-cell and somatic development in the offspring" *Diabetes* 34 (Suppl 2): 1-7.

Frendo JL, Vidaud M, Guibourdenche J, Luton D, Muller F, Bellet D, Giovagrandi Y, Tarrade A, Porquet D, Blot D, Evain-Brion D (2000) "Defect of villous cytotrophoblast differentiation into Syncytiotrophoblast in Down's Syndrome" *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85 (10): 3700-7

Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J (2001 a) "Rationale for the existence of additional adipostatic hormones" *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15: 1996-2006.

Frühbeck G, Gomez-Ambrosi J (2001 b) "Modulation of the leptin-induced white adipose tissue lipolysis by nitric oxide" *Cell Signaling* 13 (11): 827-33

Frühbeck G, Gomez-Ambrosi J (2002) "Depot-specific differences in the lipolytic effect of leptin on isolated white adipocytes" *Medical Sciences Monitoring* 8 (2): BR47-55

Galosy SS, Talamantes F (1995) "Luteotropic actions of placental lactogens at midpregnancy in mouse" *Endocrinology* 136 (9): 3993-4004.

Gavrilova O, Barr V, Marcus Samuels B, Reitman M (1997) "Hyperleptinemia of pregnancy associated with the appearance of a circulating isoform of the leptin receptor" *Journal of Biological Chemistry* 272 (48): 30546-51

Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ (2002) "Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae" *Placenta* 23: 3-19.

Gewolb IH, Merdian W, Warshaw JB, Enders AC (1986) "Fine structural abnormalities of the placenta in diabetic rats" *Diabetes* 35 (11): 1254-61.

Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G (1996) "Oxidative stress and diabetic vascular complications" *Diabetes Care* 19 (3): 257-67.

Goldman AS, Baker L, Piddington R, Marx B, Herold R, Egler J (1985) "Hyperglycemia-induced teratogenesis is mediated by a functional deficiency of arachidonic acid." *Proceedings of the National Academy of Science USA* 82 (23): 8227-31.

Goldstein R, Levy E, Shafrir E (1985) "Increased maternal-fetal transport of fat in diabetes assessed polyunsaturated fatty acid content in fetal lipids" *Biology of the Neonate* 47 (6): 343-9

González E, Jawerbaum A, Novaro V, Gimeno MAF (1995) "The role of nitric oxide in the metabolism of labelled glucose in isolated rat uterus. Influence of 17-beta estradiol" *Prostaglandins* 50: 225-235.

González E, Jawerbaum A, Novaro V, Sinner D, Gimeno M (1998) "Nitric oxide modulates placental prostanoid production from late pregnant non-insulin dependent diabetic rat" *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids* 59 (5): 299-304.

Gonzalez E, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, Xaus C, Peralta C, Gomez G, Rosello-Catafau J, Gelpi E, Gimeno M (1999) "Evolution of streptozotocin-pancreatic damage in the rat: modulatory effect of endothelins on the nitridergic and prostanoid pathway" *Nitric Oxide Biology and Chemistry* 3 (6): 459-66.

Gonzalez E, Rosello-Catafau J, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, Vela J, White V, Xaus C, Peralta C, Gimeno M (2000) "Pancreatic nitric oxide and oxygen free radicals in the early

stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat.” Brazilian Journal of Medical and Biological Research 33 (11): 1335-42.

González E (2001 a) “Destrucción de las células beta en la diabetes mellitus y respuesta a los antioxidantes” Experto Invitado de la Publicación *on line* de la Sociedad Iberoamericana de Información Científica (SIIC), Buenos Aires, Argentina. (En Internet: www.siicsalud.com).

González E, Rosello-Catafau J, Jawerbaum A, Vela J, Sinner D, Pustovrh C, White V, Xaus C, Peralta C, Gimeno M (2001 b) “Involvement of inducible isoforms of COX and NOS in streptozotocin-pancreatic damage in the rat: interactions between nitridergic and prostanoid pathway” Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids 64 (6): 311-6

Guibourdenche J, Tarrade A, Laurendeau I, Rochette-Egly C, Chambon P, Vidaud M, Evain-Brion D (2000) “Retinoids stimulate leptin synthesis and secretion in human syncytiotrophoblast” Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 85: 2550-5.

Haffner SM (1998) “Management of dyslipidemia in adults with diabetes” Diabetes Care 21 (1): 160-78.

Hagen T, Taylor CT, Lam F, Moncada S (2003) “Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha” Science 302 (5652): 1975-8.

Haggarty P (2004) “Effect of placental function on fatty acid requirements during pregnancy” European Journal of Clinical Nutrition 58 (12): 1559-70.

Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidathusein N, Denton DA, Friedman JM (1997) “Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice” Proceedings of the National Academy of Science USA 94 (16): 8878-83.

Halushka PV, Rogers RC, Loadholt CB, Colwell JA (1981) "Increased platelet thromboxane synthesis in diabetes mellitus" *Journal of Laboratory & Clinical Medicine* 97 (1): 87-96.

Harrison HE, Reece AH, Johnson M (1980) "Effect of insulin treatment on prostacyclin in experimental diabetes" *Diabetologia* 18 (1): 65-8.

Hauguel-de Mouzon S, Shafir E (2001) "Carbohydrate and fat metabolism and related hormonal regulation in normal and diabetic placenta" *Placenta* 22 (7): 619-27.

Havel PJ (2000) "Role of adipose tissue in body-weight regulation: mechanisms regulating leptin production and energy balance" *Proceedings of the Nutrition Society* 59 (3): 359-71.

Hendrickse W, Stammers JP, Hull D (1985) "The transfer of free fatty acids across the human placenta" *British Journal of Obstetrics and Gynecology* 92 (9): 945-52.

Henson MC & Castracane DV (2000) "Leptin in pregnancy" *Biology of Reproduction* 63: 1219-28.

Herrera E, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA (1987) "Lipid metabolism in pregnancy" *Biology of the Neonate* 51 (2): 70-7

Herrera E, Amusquivar E (2000) "Lipid metabolism in the fetus and the newborn" *Diabetes and Metabolism Research and Reviews* 16: 202-10

Herrera E (2002) "Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental and post natal development—a review" *Placenta* 23 A: S9-19.

Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z. (1987) "Macrophage Cytotoxicity: Role for L-Arginine Deiminase and Imino Nitrogen Oxidation to nitrite." *Science* 23;235 (4787): 473-6.

Hofmann F, Ammendola A, Schlossmann J (2000) "Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases" *Journal of Cell Science* 113: 1971-6.

Hoggard N, Hunter L, Duncan J, Williams L, Trayhurn P, Mercer J (1997) "Leptin and leptin receptor mRNA and protein expression in the murine fetus and placenta." *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94: 11073-8.

Hoggard N, Crabtree J, Allstaff S, Abramovich DR, Haggarty P (2001) "Leptin secretion to both the maternal and fetal circulation in the ex-perfused human term placenta" *Placenta* 22 (4): 347-52.

Holmqvist B, Ellinsen B, Forsell J, Zhdanova I, Alm P (2004) "The early ontogeny of neuronal nitric oxide synthase systems in the zebrafish" *Journal of Experimental Biology* 207 (Pt 6): 923-35.

Hoshina S, Husa R, Pattillo R, Boime I (1983) "Cytological distribution of chorionic gonadotropin subunit and placental lactogen messenger RNA in neoplasms derived from human placenta" *Journal of Cell Biology* 97 (4): 1200-6

Housecknecht K, Clifton AB, Matteri RL, Spurlock ME (1998) "The biology of leptin: A review" *Journal of Animal Science* 76: 1405-20.

Huang HF, Wang B, Yang XF, Luo Q, Sheng JZ (2005) "Nitric oxide mediates inhibitory effect of leptin on insulin-like growth factor I augmentation of 17 beta-estradiol production in human granulosa cells" *Biology of Reproduction* 72 (1): 102-6.

Hummel L, Schirrmeister W, Zimmerman T (1975) "Transfer of maternal plasma free fatty acids into the rat fetus" *Acta of Biological Medicine of Germany* 34 (4): 603-5.

Hummel L, Schwartze A, Schirrmeister W, Wagner H (1976 a) "Maternal plasma triglycerides as a source of fetal fatty acids" *Acta of Biological Medicine of Germany*. 35(12):1635-41.

Hummel L, Schirrmeister W, Wagner H.(1976 b) "Quantitative evaluation of the maternal-fetal transfer of free acids in the rat" *Biology of the Neonate* 265 (3 y 4): 263-7.

Hwa JJ, Ghibaudi L, Compton D, Fawzi AB, Strader CD (1996) "Intracerebroventricular injection of leptin increases thermogenesis and mobilizes fat metabolism in ob/ob mice" *Hormone & Metabolism Research*. 28 (12): 659-63.

Ishida K, Murakami T, Mizuno A, Iida M, Kuwajima M, Shima K (1997) "Leptin suppresses basal insulin secretion from rat pancreatic islets" *Regulation Peptides* 70 (2-3): 179-82.

Islami D, Bischof P, Chardonens D (2003) "Possible interactions between leptin, gonadotrophin-releasing hormone (GnRH-I and II) and human chorionic gonadotrophin (hCG)" *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproduction Biology* 110 (2): 169-75.

Jakimiuk AJ, Skalba P, Hutterski D, Tarkowski R, Haczynski J, Magoffin DA (2003) "Leptin messenger ribonucleic acid (mRNA) content in the human placenta at term: relationship to levels of leptin in cord blood and placental weight" *Gynecological Endocrinology* 17 (4): 311-316.

Jameson JL, Hollenberg AN (1993) "Regulation of chorionic gonadotropin gene expression." *Endocrinology Reviews* 14 (2): 203-21.

Jawerbaum A, Franchi AM, Gonzalez ET, Novaro V, Gimeno MA (1995) "Hyperglycemia promotes elevated generation of TXA2 in isolated rat uteri" *Prostaglandins* 50 (1): 47-56.

Jawerbaum A, Roselló-Catafau J, Gonzalez E, Novaro V, Gomez G, Gelpi E, Gimeno MA (1996 a) “Eicosanoid production, metabolism and contractile activity in the isolated uterus from non-insulin-dependent diabetic rats during late pregnancy” *Prostaglandins* 51 (5): 307-20.

Jawerbaum A, Gonzalez ET, Faletti A, Novaro V, Vitullo A, Gimeno MA (1996 b) “ Altered prostanoid production by cumulus-oocyte complexes in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus” *Prostaglandins* 52 (3): 209-19.

Jawerbaum A, Gonzalez ET, Novaro V, Faletti A, Gimeno MA (1998 a) “Nitric oxide mediates increased prostaglandin E production by oocyte-cumulus complexes in the non-insulin-dependent diabetic rat” *Reproduction Fertility Development* 10 (2): 185-90.

Jawerbaum A, Gonzalez ET, Novaro V, Faletti A, Sinner D, Gimeno MA (1998 b) “Increased prostaglandin E generation and enhanced nitric oxide synthase activity in the non-insulin-dependent diabetic embryo during organogenesis” *Reproduction Fertility & Development* 10 (2): 191-6.

Jawerbaum A, Gonzalez ET, Pustovrh C, Sinner D, Perotti C, Gimeno MA (1999) “Diminished levels of prostaglandin E in type I diabetic oocyte-cumulus complexes. Influence of nitric oxide and superoxide dismutase” *Reproduction Fertility & Development* 11 (2): 105-10

Jawerbaum A, Gonzalez ET, Sinner D, Pustovrh C, White V, Gimeno MA (2000) “Diminished PGE2 content, enhanced PGE2 release and defects in 3H-PGE2 transport in embryos from overtly diabetic rats” *Reproduction Fertility & Development* 12 (3-4): 141-7.

Jawerbaum A, Sinner D, White V, Pustovrh C, Capobianco E, Gimeno MA, Gonzalez ET (2001) “Modulation of PGE2 generation in the diabetic embryo: effect of nitric oxide and

superoxide dismutase.” Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 64(2):127-33.

Jawerbaum A, Sinner D, White V, Pustovrh C, Capobianco E, Gonzalez E (2002)
“Modulation of nitric oxide concentration and lipid metabolism by 15-deoxy $\Delta^{12,14}$
prostaglandin J₂ in embryos from control and diabetic rats during early organogenesis”
Reproduction 124: 625-31

Jawerbaum AS, González E (2005 a) “The role of alterations in arachidonic acid
metabolism and nitric oxide homeostasis in rat models of diabetes during early pregnancy”
Current Pharmaceutical Design 11: 1327-42

Jawerbaum AS, Higa R, White V, Capobianco E, Pustovrh C, Sinner D, Martínez N,
González E (2005 b) “Peroxynitrites and impaired modulation of nitric oxide
concentrations in embryos from diabetic rats during early organogenesis” *Reproduction*, en
prensa.

Jollie WP (1990) “Development, morphology, and function of the yolk-sac placenta of
laboratory rodents” *Teratology* 41 (4): 361-81.

Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE (1967) “Studies of the
diabetogenic action of streptozotocin” *Proceedings of the Society of Experimental Biology
and Medicine* 126 (1): 201-5.

Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE (1969) “Diabetogenic action of
streptozotocin: relationship of dose to metabolic response” *Journal of Clinical Investigation*
48 (11): 2129-39.

Kahn NN, Acharya K, Bhattacharya S, Acharya R, Mazumder S., Bauman WA, Sinha AK
(2000) “Nitric oxide: the second messenger of insulin” *International Union of Biochemistry
and Molecular Biology Life* 49 (5): 441-50.

Kalkhoff RK (1982) "Metabolic effects of progesterone" *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 142 (6 Pt 2): 735-8.

Kaminsky S, Sibley CP, Maresh M, Thomas CR, D'Souza SW (1991) "The effects of diabetes on placental lipase activity in the rat and human" *Pediatric Research* 30 (6): 541-3.

Kaufman MH (1990) "Post implantation mammalian embryos. Practical approach" Chap 4 "Morphological stages of postimplantation embryonic development" Oxford University Press 81-91.

Kaufman MH, Bard JBL (1999) "The anatomical basis of mouse development" Academic Press.

Kaufmann P, Black S, Huppertz B (2003) "Endovascular trophoblast invasion: Implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia." *Biology of Reproduction* 69: 1-7.

Kawai M, Murakami T, Otani S, Shima K, Yamaguchi M, Kishi K (1999) "Colocalization of leptin receptor (OB-R) mRNA and placental lactogen-II in rat trophoblast cells: gestational profile of OB-R mRNA expression in placentae" *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 257 (2): 425-30.

Kellerer M, Lammers R, Fritsche A, Strack V, Machicao F, Borboni P, Ullrich A, Haring HU (2001) "Insulin inhibits leptin receptor signaling in HEK293 cells at the level of janus kinase-2: a potencial mechanism for hyperinsulinemia-associated leptin resistance" *Diabetologia* 44 (9): 1125-32.

Kieffer TJ, Heller RS, Leech CA, Holz GG, Habener JF (1997) "Leptin suppression of insulin secretion by the activation of ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic beta-cells" *Diabetes* 46 (6): 1087-93.

Kissner R, Nauser T, Bugnon P, Lye PG, Koppenol WH (1997) "Formation and properties of peroxynitrite as studied by laser photolysis, high-pressure stopped-flow technique, and pulse radiolysis" *Journal of Biological Chemistry* 272 (11):1285-92

Kitzmler JL, Cloherty JP, Younger MD, Tabatabaie A, Rothchild SB, Sosenko I, Epstein MF, Singh S, Neff RK (1978) "Diabetic pregnancy and perinatal morbidity" *American Journal of Gynecology* 131 (5): 560-80

Kleeman R, Rothe H, Kolb-Bachofen V, Xie QW, Nathan C, Martin S, Kolb H (1993) "Transcription and translation of inducible nitric oxide synthase in the pancreas of prediabetic BB rats" *Letters of the Federation of European Biochemical Societies* 328 (1-2): 9-12.

Klein DJ, Aronson Friedman L, Harlan WR, Barton BA, Schreiber GB, Cohen RM, Harlan LC, Morrison JA (2004) "Obesity and the development of insulin resistance and impaired fasting glucose in black and white adolescent girls: a longitudinal study" *Diabetes Care*. 27 (2): 378-83.

Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF 3rd. (1986) "Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae." *Endocrinology* 118 (4): 1567-82.

Knauf C, Prevot V, Stefano GB, Mortreux G, Beauvillain JC, Croix D (2001) "Evidence for a spontaneous nitric oxide release from the rat median eminence: influence on gonadotropin-releasing hormone release" *Endocrinology* 142 (6): 2343-50.

Knopp RH, Warth MR, Charles D, Childs M, Li JR, Mabuchi H, Van Allen MI (1986) "Lipoprotein metabolism in pregnancy, fat transport to the fetus, and the effects of diabetes." *Biology of the Neonate* 50 (6): 297-317.

Kossenjans W, Eis A, Sahay R, Brokman D, Myatt L (2000) "Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia" *American Journal of Physiology. Heart and Circulation Physiology* 278 (4): 1311-9.

Kuhn DC, Crawford MA, Stuart MJ, Botti JJ, Demers LM (1990) "Alterations in transfer and lipid distribution of arachidonic acid in placentas of diabetic pregnancies" *Diabetes* 39 (8): 914-8.

Ladenheim RG, Tesone M, Charreau EH (1984) "Insulin action and characterization of insulin receptors in rat luteal cells" *Endocrinology* 115 (2): 752-6.

Ladyman SR, Grattan DR (2004) "Region-specific reduction in leptin-induced phosphorylation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in the rat hypothalamus is associated with leptin resistance during pregnancy" *Endocrinology* 145 (8): 3704-11.

Larsen WJ (1997) "Human embryology" Churchill Livingstone, New York

Lea RG, Howe D, Hannah LT, O'Bohannon O, Hunter L, Hoggard N. (2000) "Placental leptin in normal, diabetic and fetal growth retarded pregnancies" *Molecular Human Reproduction* 6 (8): 763-9

Lee Q & Juchau M (1994) "Dysmorphogenetic 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

Lee QP, Park HW, Thayer J, Mirkes P, Juchau MR (1996) "Apoptosis induced in cultured rat embryos by intra-amniotically microinjected sodium nitroprusside" *Teratology* 53 (1):

21-30

Lepercq J, Cauzac M, Lahlou N, Timsit J, Girard J, Auwerx J, Hauguel-de Mouzon S (1998) "Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy" *Diabetes* 47: 847-50.

Leturque A, Hauguel S, Sutter Dub MT, Maulard P, Girard J (1989) "Effects of placental lactogen and progesterone on insulin stimulated glucose metabolism in rat muscles in vitro" *Diabetes Metabolism* 15 (4): 176-81.

Licht P, Cao H, Lei ZM, Rao CV, Merz WE (1993) "Novel self-regulation of human chorionic gonadotropin biosynthesis in term pregnancy human placenta" *Endocrinology* 133 (6): 3014-25.

Lin DS, Pitkin RM, Connor WE (1977) "Placental transfer of cholesterol into the human fetus" *Journal of Obstetrics and Gynecology* 128: 735-9.

Lindegaard MLS, Nielsen JE, Hannibal J, Nielsen LB (2005) "Expression of the endothelial lipase gene in murine embryos and reproductive organs" *Journal of Lipid Research* 46: 439 - 444.

Lyall F, Gibson JL, Greer IA, Brokman DE, Eis AL, Myatt L (1998) "Increased nitrotyrosine in the diabetic placenta: evidence for oxidative stress" *Diabetes Care* 21 (10): 1753-8

Lyall F (2002) "The human placental bed revisited" *Placenta*. 23 (8-9): 555-62.

Ma L (1993) "Evidence for nitric oxide-generator cells in the brain" *The Bulletin of Tokyo Medical and Dental University* 40 (3): 125-34.

- Machinal-Quelin F, Dieudonne MN, Leneuve MC, Pecquery R, Giudicelli Y (2002) "Proadipogenic effect of leptin on rat preadipocytes in vitro: activation of MAPK and STAT3 signaling pathways" *American Journal of Cell Physiology* 282 (4): C853-63.
- Madar Z, Kalet-Litman S, Stark AH (2004) "Inducible nitric oxide synthase activity and expression in liver and hepatocytes of diabetic rats" *Pharmacology* 73 (2): 106-12.
- Madar Z, Kalet-Litman S, Stark AH (2005) "Inducible nitric oxide synthase activity and expression in live hepatocytes of diabetic rats" *Pharmacology* 73 (2): 106-12.
- Magness RR, Shaw CE, Phernetton TM, Zheng J, Bird IM (1997) "Endothelial vasodilator production by uterine end systemic arteries. II. Pregnancy effects on NO synthase expression" *American Journal of Physiology* 272 (4 Pt 2): 1730-40.
- Malassine A, Besse C, Roche A, Alsat E, Rebourcet R, Mondon F, Cedard L (1987) "Ultrastructural visualization of the internalization of low density lipoprotein by human placental cells" *Histochemistry* 87 (5): 457-64.
- Malassine A, Frendo JL, Evain-Brion (2003) "A comparison of placental development and endocrine functions between the human and the mouse model" *Human Reproduction Update* 9 (6): 531-9.
- Maldonado A, Trueheart PA, Renold AE, Sharp GW. (1976) "Effects of streptozotocin in vitro on proinsulin biosynthesis, insulin release and ATP content of isolated rat islets of Langerhans" *Diabetologia* 12 (5): 471-81
- Manderson JG, Patterson CC, Hadden DR, Traub AI, Leslie H, McCance DR (2002) "Leptin concentrations in maternal serum and cord blood in diabetic and nondiabetic pregnancy" *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 188 (5): 1326-32.

Mandl M, Haas J, Bischof P, Nohammer G, Desoye G (2002) "Serum-dependent effects of IGF-I and insulin on proliferation and invasion of human first trimester trophoblast cell models" *Histochemistry Cellular Biology* 117 (5): 391-9.

Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, Hill RA (2002) "Leptin: A review of its peripheral actions and interactions" *International Journal of Obesity* 26: 1407-33.

Martínez-Frías ML, Bermejo E, Rodríguez-Pinilla E, Prieto L (1998) "Epidemiological análisis of outcomes of pregnancy in gestational diabetic mothers" *American Journal of Medical Genetics* 78 (2): 140-5.

Masuzaki H, Ogawa y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Mori T, Nakao K (1997) "Nonodipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans" *Nature Medicine* 3 (9): 1029-33.

Mateo J, García-Lecea M, Cadenas S, Hernández C, Moncada S (2003) "Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha by nitric oxide through mitochondria-dependent and independent pathways" *Journal of Biochemistry* 376 (Pt 2): 537-44.

McAlister ED, Van Vugt DA (2004) "Effect of leptin administration versus re-feeding on hypothalamic neuropeptide gene expression in fasted male rats" *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 82 (12):1128-34.

McGarry D (2002) "Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 Diabetes" *Diabetes* 51: 7-18.

McNeill JH (1999) "Streptozotocin-induced diabetes: Induction, mechanisms and dose dependency" Ch 1, Section 1, *Experimental models of diabetes* CRC Press LLC 3-19

Merz WE (1994) "The primate placenta and human chorionic gonadotropin." *Experimental and Clinical Endocrinology* 102 (3): 222-34.

Mills JL, Baker L, Goldman AS (1979) "Malformation in infants of diabetic mothers occur before the seventh gestational week. Implications for treatment" *Diabetes* 28 (4): 292-3.

Minsker DH, MacDonald JS, Robertson RT, Bokelman DL (1983) " Mevalonate supplementation in pregnant rats suppresses the teratogenicity of mevinolinic acid, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase" *Teratology* 28 (3): 449-56.

Mizuno A, Murakami T, Otani S, Kuwajima M, Shima K (1998) "Leptin affects pancreatic endocrine functions through the sympathetic nervous system" *Endocrinology* 139 (9): 3863-70.

Moley KH (2001) "Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women" *Trends in Endocrinology and Metabolism* 12 (2): 78-82.

Molin DG, Roest PA, Nordstrand H, Wisse LJ, Poelmann RE, Eriksson UJ, Gittenberger-De Groot AC (2004) "Disturbed morphogenesis of cardiac outflow tract and increased rate of aortic arch anomalies in the offspring of diabetic rats" *Birth Defects Research part A: Clinical and Molecular Teratology* 70 (12): 927-38

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology" *Pharmacological Reviews* 43 (2): 109-42.

Movassat J, Saulnier C, Portha B (1997) "Insulin administration enhances growth of the beta-cell mass in streptozotocin-treated newborn rats" *Diabetes* 46 (9): 1445-52.

- Murohara T, Horowitz JR, Silver M, Tsurumi Y, Chen D, Sullivan A, Isner JM (1998) "Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor enhances vascular permeability via nitric oxide and prostacyclin" *Circulation* 97 (1): 99-107.
- Muoio D, Dohm GL, Coleman RA (1999) "Leptin opposes insulin's effects on fatty acid partitioning in muscles isolated from obese ob/ob mice" *American Physiology Society* E913-21.
- Myatt L, Brockman DE, Langdon G, Pollock JS (1993) "Constitutive calcium-dependent isoform of nitric oxide synthase in the human placental villous vascular tree" *Placenta* 14 (4): 373-83.
- Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Greer IA, Lyall F (1997) "Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies" *Human Reproduction* 12 (1): 167-72.
- Myatt L, Cui X (2004) "Oxidative stress in the placenta" *Histochemistry and Cell Biology* 122 (4): 369-82.
- Nakata M, Yada T (2003) "Endocrinology: nitric oxide-mediated insulin secretion in response to citrulline in islet beta-cells" *Pancreas* 27 (3): 209-13.
- Nanaev AK, Rukosuev VS, Shirinsky VP, Milovanov AP, Domogatsky SP, Duance VC, Bradbury FM, Yarrow P, Gardiner L, d'Lacey C, et al (1991) "Confocal and conventional immunofluorescent and immunogold electron microscopic localization of collagen types III and IV in human placenta" *Placenta* 12 (6): 573-95.
- Naoum HG, De Chazal RC, Eaton BM, Contractor SF (1987) "Characterization and specificity of lipoprotein binding to term human placental membranes" *Biochemica et Biophysica Acta* 902 (2): 193-9.

Nath A, Encisio J, Kuniyasu M, Hao X, Madri J, Pinter E (2004) "Nitric oxide murine yolk sac vasculogenesis and rescues glucose induced vasculopathy" *Development* 131: 2485-96.

Nathan C (1992) "Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells" *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6 (12): 3051-64.

Nelson DM, Smith RM, Jarett L (1978) "Nonuniform distribution and grouping of insulin receptors on the surface of human placental syncytial trophoblast" *Diabetes* 27 (5): 530-8.

Nestler JE (1987) "Modulation of aromatase and P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme activities of human placental cytotrophoblasts by insulin and insulin-like growth factor I" *Endocrinology* 121 (5): 1845-52.

New DA, Mizell M, Cockroft DL (1977) "Growth of opossum embryos in vitro during organogenesis" *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 41: 111-23.

New D A (1978) "Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis" *Biological Reviews* 53: 81-122.

Novaro V, González E, Jawerbaum A, Rettori V, Canteros G, Gimeno MF (1997) "Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation" *Reproduction Fertility & Development* 9 (5): 557-64.

Novaro V, Jawerbaum A, Faletti A, Gimeno MA, Gonzalez E (1998) "Uterine nitric oxide and prostaglandin E during embryonic implantation in non-insulin-dependent diabetic rats" *Reproduction Fertility & Development* 10 (3): 217-23.

Novaro V, Colman-Lerner A, Ortega FV, Jawerbaum A, Paz D, LoNostro F, Pustovrh C, Gimeno MF, González E (2001) "Regulation of metalloproteinases by nitric oxide in human trophoblast cells in culture" *Reproduction Fertility & Development* 13 (5-6): 411-20.

Ogando DG, Paz D, Cella M, Franchi AM (2003) "The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice" *Reproduction* 125 (1): 95-110.

Okereke NC, Huston-Presley L, Amini SB, Kalhan S, Catalano PM. (2004) "Longitudinal changes in energy expenditure and body composition in obese women with normal and impaired glucose tolerance" *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 287 (3): E472-9.

Ong KK, Ahmed ML, Sherriff A, Woods KA, Watts A, Golding J, Dunger DB (1999) "Cord blood leptin is associated with size at birth and predicts infancy weight gain in humans" ALSPAC Study Team. *Avon Longitudinal Study of Pregnancy and Childhood. J Clinical Endocrinology and Metabolism* 84 (3): 1145-8.

Orci L, Junod A, Pictet R, Renold AE, Rouiller C (1968) "Granulolysis in a cells of endocrine pancreas in spontaneous and experimental diabetes in animals" *Journal of Cell Biology* 38 (2): 62-6.

Ornoy A, Zaken V, Kohen R (1999) "Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzymes and low-molecular-weight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies" *Teratology* 60 (6): 376-86.

Padmanabhan R, Shafiullah M. (2001) "Intrauterine growth retardation in experimental diabetes: possible role of the placenta" *Archives of Physiology and Biochemistry* 109 (3): 260-71.

Papageorgiou I, Messinis I, Millingos S, Boli A, Kolios G, Seferiadis K (2004) "Relation between leptin and cortisol values in umbilical vessels at normal vaginal delivery" *Journal of Maternal, Fetal and Neonatal Medicine* 16 (5): 303-7.

Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hetch R, Winters D, Boone T, Collins F (1995) "Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice" *Science* 269 (5223): 540-3.

Pfeifer MA, Halter JB, Porte D Jr (1981) "Insulin secretion in diabetes mellitus" *American Journal of Medicine* 70 (3): 579-88.

Pierce RL, Pierce MR, Liu H, Kadowitz PJ, Miller MJ (1995) "Limb reduction defects after prenatal inhibition of nitric oxide synthase in rats" *Pediatric Research* 38 (6): 905-11.

Pinter E, Reece EA, Ogburn PL Jr, Turner S, Hobbins JC, Mahoney MJ, Naftolin F (1988) "Fatty acid content of yolk sac and embryo in hyperglycemia-induced embryopathy and effect of arachidonic acid supplementation" *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 159 (6): 1484-90

Pitkin RM, Connor WE, Lin DS (1972) "Cholesterol metabolism and placental transfer in the pregnant Rhesus monkey" *Journal of Clinical Investigation* 51 (10): 2584-92.

Porter JA, Young KE, Beachy PA (1996) "Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development" *274 (5285): 255-9.*

Portha B, Picon L, Rosselin G (1979) "Chemical Diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes" *Diabetologia* 17: 371-377.

- Portha B, Giroix MH, Serradas P, Morin L, Saulnier C, Bailbe D (1994) "Glucose refractoriness of pancreatic beta-cells in rat models of non-insulin dependent diabetes." *Diabetes & Metabolism* 20 (2): 108-15.
- Powell KA, Deans EA, Speake BK (2004) "Fatty acid esterification in the yolk sac membrane of the avian embryo" *Journal of Comparative Physiology Part B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 174 (2): 163-8.
- Pratt HP (1982) "Preimplantation mouse embryos synthesize membrane sterols." *Developmental Biology* 89 (1): 101-10.
- Pratten MK & Lloyd JB (1997) "Uptake of microparticles by rat visceral yolk sac" *Placenta* 18 (7): 547-52.
- Pukel C, Baquerizo H, Rabinovitch A (1988) "Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines. Synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin 1" *Diabetes* 37 (1): 133-6.
- Pustovrh MC, Jawerbaum A, Sinner D, Pesaresi M, Baier M, Micone P, Gimeno M, González E (2000) "Membrane-type matrix metalloproteinase-9 activity in placental tissue from patients with pre-existing and gestational diabetes mellitus" *Reproduction Fertility & Development* 12: 269-275.
- Pustovrh MC, Jawerbaum A, Capobianco E, White V, Lopez-Costa JJ, Gonzalez E (2005 a) "Increased matrix metalloproteinases 2 and 9 in placenta of diabetic rats at midgestation" *Placenta* 26 (4): 339-348.
- Pustovrh MC, Jawerbaum A, Capobianco E, White V, Martínez N, López-Costa JJ, González E (2005 b) "Oxidative Stress promotes the increase of matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in the fetoplacental unit of diabetic rats" *Free Radical Research* en prensa.

Raabe M, Flynn LM, Zlot CH, Wong JS, Veniant MM, Hamilton RL, Young SG (1998) “Knockout of the abetalipoproteinemia gene in mice: reduced lipoprotein secretion in heterozygotes and embryonic lethality in homozygotes” *Proceedings of the National Academy of Science USA* 95 (15): 8686-91

Rancourt SL, Rancourt DE (1997) “Murine subtilisin-like proteinase SPC6 is expressed during embryonic implantation, somitogenesis, and skeletal formation” *Developmental Genetics* 21(1):75-81

Rankin JH, Jodarski G, Shanahan MR. (1986) “Maternal insulin and placental 3-O-methyl glucose transport” *Journal of Developmental Physiology* 8 (4): 247-53

Reece EA, Pinter E, Leranath 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 (3): 363-73.

Reece EA, Wiznitzer A, Homko CJ, Hagay Z, Wu YK (1996) “Synchronization of the factors critical for diabetic teratogenesis: an in vitro model” *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 174 (4): 1284-8.

Repetto M, Maziere JC, Citadelle D, Dupuis R, Meier M, Biade S, Quiec D, Roux C (1990) “Teratogenic effect of the cholesterol synthesis inhibitor AY 9944 on rat embryos in vitro” *Teratology* 42 (6): 611-8.

Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM (1993) “Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro” *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90 (21): 10130-4.

Reynolds LP, Redmer DA (2001) "Angiogenesis in the placenta" *Biology of Reproduction* 64 (4): 1033-40.

Robertson CP, Gibbs SM, Roelink H (2001) "cGMP enhances the sonic hedgehog response in neural plate cells" *Developmental Biology* 238 (1): 157-67.

Rossmannith WG, Hoffmeister U, Wolfahrt S, Kleine B, Mc Lean M, Jacobs RA, Grossman AB (1999) "Expression and functional analysis of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human placenta" *Molecular Human Reproduction* 5 (5): 487-94.

Ryan EA, Enns L (1988) "Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance" *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 67 (2): 341-7.

Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA (2003) "Cyclic GMP Phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function" *Circulation Research* 93: 280-91.

Sadler TW, Hunter ES 3rd, Balkan W, Horton WE Jr (1988) "Effects of maternal diabetes on embryogenesis" *American Journal of Perinatology* 5 (4): 319-26.

Sagawa N, Yura S, Itoh H, Kakui K, Takemura M, Nuahmah M, Ogawa Y, Masuzaki H, Nakao K, Fujii S (2002) "Possible role of placental leptin in pregnancy" *Endocrine* 19 (1): 65-71.

Sainsbury A, Cusin I, Doyle P, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B (1996) "Intracerebroventricular administration of neuropeptide Y to normal rats increases obese gene expression in white adipose tissue" 39 (3): 353-6.

Saldeen P, Olofsson P, Laurini RN (2002) "Structural, functional and circulatory placental changes associated with impaired glucose metabolism" *European Journal of Obstetrics and Gynecology Reproduction Biology* 105 (2): 136-42.

Sambandam N, Abrahani MA, Craig S, Al-Atar O, Jeon E, Rodrigues B (2000) "Metabolism of VLDL is increased in streptozotocin-induced diabetic rat hearts" *American Journal of Physiology. Heart Circulation Physiology* 278 (6): H1874-82.

Sarmiento U, Benson B, Kaufman S, Ross L, Qi M, Scully S, DiPalma C (1997) "Morphologic and molecular changes induced by recombinant human leptin in the white and brown adipose tissues of C57BL/6 mice" *Laboratory Investigations* 77 (3): 243-56.

Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, Sasaki T, Tsujioka K, Malkino H, Kashihara N (2005) "NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy" *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 288 (6): F1144-52.

Schiff R, Arensburg J, Itin A, Keschet E, Orly J (1993) "Expression and cellular localization of uterine side-chain cleavage of cytochrome P450 messenger ribonucleic acid during early pregnancy in mice" *Endocrinology* 133 (2): 529-537.

Schonfelder G, John M, Hopp H, Fuhr N, van Der Giet M, Paul M (1996) "Expression of inducible nitric oxide synthase in placenta of women with gestational diabetes" *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 10 (7): 777-84.

Segal KR, Landt M, Klein S (1996) "Relationship between insulin sensitivity and plasma leptin concentration in lean and obese men" *Diabetes* 45 (7): 988-91.

Señarís R, García Caballero T, Casabiell X, Gallego R, Castro R, Considine R, Dieguez C,

Casanueva F (1997) "Synthesis of leptin in human placenta" *Endocrinology* 138 (10): 4501-4.

Seufert J, Kieffer TJ, Leech CA, Holz GG, Moritz W, Ricordi C, Habener JF (1999) "Leptin suppression of insulin secretion and gene expression in human pancreatic islets: implications for the development of adipogenic diabetes mellitus" *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84 (2): 670-6.

Shafrir E, Khassis S (1982) "Maternal-fetal fat transport versus new fat synthesis in the pregnant diabetic rat" *Diabetologia* 22 (2): 111-7.

Shafrir E, Barash V (1987) "Placental function in maternal-fetal transport in diabetes" *Biology of the Neonate* 51 (2): 102-12.

Shafrir E, Barash V (1991) "Placental glycogen metabolism in diabetic pregnancy" *Israel Journal of Medicine Science* 27 (8-9): 449-61.

Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, Newgard CB, Unger RH (1997) "Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues" *Proceedings of the National Academy of Science* 94 (9): 4242-5.

Shubert PJ, Gordon MC, Landon MB, Gabbe SG, Kniss DA (1996) "Ketoacids attenuate glucose uptake in human trophoblasts isolated from first-trimester chorionic villi" *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 175 (1): 56-62.

Sinha MK, Opentanova I, Ohannesian JP, Kolaczynski JW, Heiman ML, Hale J, Becker G, Bowsher RR, Stephens TW, Caro JF (1996) "Evidence of free and bound leptin in human circulation" *Journal of Clinical Investigation* 98 (6): 1277-92.

Sinner D, Jawerbaum A, Pustovrh C, White V, Capobianco E, Gonzalez E (2002) "Levels of

endothelin-1 in embryos from control and neonatal streptozotocin-induced diabetic rats, and their relationship with nitric oxide generation” *Reproduction Fertility & Development* 14 (1-2): 23-8.

Sinner D, Caviglia M, Jawerbaum A, Igal A, González E (2003) “Lipid metabolism in the embryos of diabetic rats during early organogenesis: modulatory effect of prostaglandin E₂” *Reproduction, Fertility & Development* 15: 1-6.

Sivitz WI, Bailey HL, Donohoue P (1996) “Rat adipose ob mRNA levels in states of altered circulating glucose and insulin” *Biochemical and Biophysics Research Communications* 220 (3): 520-5.

Sivitz WI, Walsh S, Morgan D, Donohue P, Haynes W, Leibel RL (1998) “Plasma leptin in diabetic and insulin-treated diabetic and normal rats” *Metabolism* 47 (5): 584-91.

Smith JT, Waddell BJ (2003) “Leptin distribution and metabolism in the pregnant rat: Transplacental leptin passage increases in late gestation but is reduced by excess glucocorticoides” *Endocrinology* 144: 3024-30.

Spinella JC, Mager M (1966) “Modified enzymatic procedure for the routine determination of glycerol and triglycerides in plasma” *Journal of Lipid Research* 7: 167-9.

Srikanta S, Ricker AT, McCulloch DK, Soeldner JS, Eisenbarth GS, Palmer JP (1986) “Autoimmunity to insulin, beta cell dysfunction, and development of insulin-dependent diabetes mellitus *Diabetes*” 35 (2): 139-42.

Stryer L (1988) “*Biochemistry*” Stanford University Press, Stanford, USA.

Styrud J, Thunberg L, Nybacka O, Eriksson UJ (1995) "Correlations between maternal metabolism and deranged development in the offspring of normal and diabetic rats" *Pediatric Research* 37 (3): 343-53.

Sugden MC, Langdown ML, Munns MJ, Holness MJ (2001) "Maternal glucocorticoid treatment modulates placental leptin and leptin receptor expression and materno-fetal leptin physiology during late pregnancy, and alicits hypertension associated with hyperleptinaemia in the early-growth-retarded adult offspring" *European Journal of Endocrinology* 145: 529-39.

Surwit RS, Feinglos MN (1988) "Stress and autonomic nervous system in type II diabetes. A hypothesis" *Diabetes Care* 11 (1): 83-5.

Swain JE, Dunn RL, McConnell D, González-Martínez J, Smith GD (2004) "Direct effects of leptin on mouse reproductive function: regulation of follicular, oocyte, and embryo development" *Biology of Reproduction* 71 (5): 1446-52.

Syal A, Okawa T, Vedernikov Y, Chwalisz K, Saade GR, Garfield RE (1999) "Effect of placental tissue on inhibition of uterine contraction by nitric oxide donors" *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 181 (2): 415-8.

Szabo AJ, Szabo O (1974) "Placental free-fatty-acid transfer and fetal adipose-tissue development: an explantation of fetal adiposity in infants of diabetic mothers" *Lancet* 31 (2): 498-9

Szabó C (2003) "Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity" *Toxicology Letters* 140-141: 105-12.

Takizawa T, Yoshikawa H, Yamada M, Morita H (2002) "Expression of nitric oxide synthase isoforms and detection of nitric oxide in rat placenta" 282 (4): 762-7.

Tannenbaum GS, Gurd W, Lapointe M (1998) "Leptin is a potent stimulator of spontaneous pulsatile growth hormone (GH) secretion and the GH response to GH-releasing hormone" *Endocrinology* 139 (9): 3871-5.

Teasdale F (1981) "Histomorphometry of the placenta of the diabetic women: class A diabetes mellitus" *Placenta* 2 (3): 241-51.

Teasdale F (1983) "Histomorphometry of the human placenta in Class B diabetes mellitus" *Placenta* 4 (1): 1-12.

Telfer JF, Itoh H, Thomson AJ, Norman JE, Nakao K, Campa JS, Poston L, Tribe RM, Magness RR (2001) "Activity and expression of soluble and particulate guanylate cyclases in myometrium from nonpregnant and pregnant women: down-regulation of soluble guanylate cyclase at term" *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86 (12): 5934-43.

Tesone M, Ladenheim RG, Oliveira-Filho RM, Chiauzzi VA, Foglia VG, Charreau EH (1983) "Ovarian dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats" *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 174 (1): 123-30.

Testar X, Lasuncion MA, Chieri R, Herrera E (1985) "Effects of exogenous insulin on placental transfer of maternal glucose to the rat fetus" *Diabetologia* 28 (10): 743-8.

Thaler C, Epel D (2003) "Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya" *Current Pharmaceutical Design* 9: 399-409.

Thomas CR.(1987) " Placental transfer of non-esterified fatty acids in normal and diabetic pregnancy" *Biology of the Neonate* 51 (2): 94-101.

Tiefenbacher CP, Kreuzer J (2003) "Nitric oxide-mediated endothelial dysfunction –is there need to treat?" *Current Vascular Pharmacology* 1 (2): 123-33.

Tormo MA, Leon-Quinto T, Saulnier C, Bailbe D, Serradas P, Portha B (1997) "Insulin secretion and glucose tolerance after islet transplantation in rats with noninsulin-dependent diabetes induced by neonatal streptozotocin" *Cell Transplant* 6 (1): 23-32.

Tulenko TN (1981) "The actions of prostaglandins and cyclo-oxygenase inhibition on the resistance vessels supplying the human fetal placenta" *Prostaglandins* 21 (6): 1033-43.

Uehara T, Kikuchi Y, Nomura Y (1999) "Caspase activation accompanying cytochrome c release from mitochondria is possibly involved in nitric oxide-induced neuronal apoptosis in SH-SY5Y cells" *Journal of Neurochemistry* 72 (1): 196-205.

Ueno K (2000) "Involvement of fatty acid in axonal development in mouse embryos" *Genes to Cells* 5 (10): 859-69.

Unger RH, Grundy S (1985) "Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes" *Diabetologia* 28 (3): 119-21.

Unger RH, Zhou YT (2001) "Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover" *Diabetes* 50 (1): S118-21

Waltman R, Tricomi V, Shabanah EH, Arenas R (1978) "Prolongation of rat gestation time by unsaturated fatty acids" *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 131 (7): 735-8

Wang Q, Bing C, Al-Barazanji K, Mossakowaska DE, Wang XM, McBay DL, Neville WA, Taddayon M, Pickavance L, Dryden S, Thomas ME, McHale MT, Gloyer IS, Wilson S, Buckingham R, Arch JR, Trayhurn P, Williams G (1997) "Interactions between leptin and hypothalamic neuropeptide Y neurons in the control of food intake and energy homeostasis in the rat" *Diabetes* 46 (3): 335-41.

Wang MY, Koyama K, Shimabukuro M, Mangelsdorf D, Newgard CB, Unger RH (1998) "Overexpression of leptin receptors in pancreatic islets of Zucker diabetic fatty rats restores GLUT-2, glucokinase, and glucose-stimulated insulin secretion" *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95 (20): 11921-6.

Ward WK, Bolgiano DC, McKnight B, Halter JB, Porte D Jr (1984) "Diminished beta cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus" *Journal of Clinical Investigation* 74 (4): 1318-28.

Wasserman L, Shlesinger H, Abramovici A, Goldman JA, Allalouf D (1980) "Glycosaminoglycan patterns in diabetic and toxemic term placentas" *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 138 (7 Pt 1): 769-73.

Wautier JL, Schmidt AM (2004) "Protein Glycation. A firm link to endothelial dysfunction" *Circulation Research* (95):233-8.

Weisbrod RM, Brown ML, Cohen RA (1993) "Effect of elevated glucose on cyclic GMP and eicosanoids produced by porcine aortic endothelium" *Arteriosclerosis and Thrombosis* 13 (6): 915-23.

Welt CK, Schneyer AL, Heist K, Mantzoros CS (2003) "Leptin and soluble leptin receptor in follicular fluid" *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 20 (12): 495-501.

Wenger RH, Kvietikova I, Rolfs A, Gassmann M, Marti HH (1997) "Hypoxia-inducible factor-1 alpha is regulated at the post-mRNA level" *Kidney International* 51 (2): 560-3.

Wentzel P, Eriksson UJ (1998) "Antioxidants diminish developmental damage induced by high glucose and cyclooxygenase inhibitors in rat embryos in vitro" *Diabetes* 47 (4): 677-84.

Wentzel P, Welsh N, Eriksson UJ (1999) "Developmental damage, increased lipid peroxidation, diminished cyclooxygenase-2 gene expression, and lowered prostaglandin E2 levels in rat embryos exposed to a diabetic environment" *Diabetes* 48 (4): 813-20.

Wentzel P, Eriksson UJ (2002) "8-Iso-PGF(2alpha) administration generates dysmorphogenesis and increased lipid peroxidation in rat embryos in vitro" *Teratology* 66 (4): 164-8.

White V, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, Capobianco E, Gonzalez E (2002) "Oxidative stress and altered prostanoid production in the placenta of streptozotocin-induced diabetic rats" *Reproduction Fertility & Development* 14 (1-2): 117-23.

Winkel CA, MacDonald PC, Simpson ER (1981) "The role of receptor-mediated low-density lipoprotein uptake and degradation in the regulation of progesterone biosynthesis and cholesterol metabolism by human trophoblasts" *Placenta* 3: 133-43.

Wiznitzer A, Furman B, Zuili I, Shany S, Reece EA, Mazor M (2000) "Cord leptin level and fetal macrosomia" *Obstetrics and Gynecology* 96 (5 Pt 1): 707-13.

Wolf G (1999) "The function of cholesterol in embryogenesis" *Journal of Nutritional Biochemistry* 10 (4): 188-92.

Wu TP, Huang BM, Tsai HC, Lui MC, Liu MY (2004) "Effects of nitric oxide on human spermatozoa activity, fertilization and mouse embryonic development" *Archives of Andrology* 50 (3): 173-9.

Yamaguchi M, Murakami T, Yasui Y, Otani S, Kawai M, Kishi K, Kurachi H, Shima K, Aono T, Murata Y (1998) "Mouse placental cells secrete soluble leptin receptor (sOB-R): cAMP inhibits sOB-R production" *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 252 (2): 363-7.

Young DA, King DS, Chen M, Norris B, Nemeth PM (1988) “A novel method for measurement of triglyceride lipase activity: suitable for microgram and nanogram quantities of tissue” *Journal of Lipid Research* 29: 527-32.

Yura S, Sagawa N, Yoshihiro O, Hiroaki M, Mise H, Matsumoto T, Ebihara K, Fujii S, Nakao K (1998) “Augmentation of leptin synthesis and secretion through activation of protein kinases A and C in cultured human trophoblastic cells” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83: 3609-14.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM (1994) “Positional cloning of the ob mouse obese gene and its human homologue” *Nature* 372 (6505): 425-32.

Zonana J, Rimoin DL (1976) “Inheritance of diabetes mellitus” *New England Journal of Medicine* 295 (11): 603-5

Abreviaturas

ADN ácido desoxirribonucleico
ADP adenosín difosfato
AMPc adenosín monofosfato en forma cíclica
ATP adenosín trifosfato
C control
Ca⁺⁺ catión bivalente de calcio
cGMP guanosín monofosfato en forma cíclica
CO₂ dióxido de carbono
CoA coenzima A
c/lep con agregado de leptina
c/NMMA con agregado de N^G-monometil-L-arginina
c/NP con agregado de nitroprusiato
c/SP con agregado de espermin-NONOato
D diabético
DAB diaminobencidina
db gen del receptor de leptina
DTT DL- Ditiotreitól
DHAP dihidroxiacetona fosfato
DMEM-F12 medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco suplementado con mezcla de nutrientes F-12
D-MEM medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
EDTA tetra acetato de etildiamina
eNOS isoforma endotelial de la óxido nítrico sintasa
iNOS isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa
G3P gliceraldehído 3 fosfato
G3PDH gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GHRH hormona liberadora de hormona de crecimiento
GK fosforilasa de glicerol
GLP-1 péptido similar al glucagon 1
GnRH hormona liberadora de gonadotrofinas
HANK's solución salina balanceada creada por HANK
H₂O agua
H₂O₂ peróxido de hidrógeno
hCG gonadotrofina coriónica humana
HCl ácido clorhídrico
HDL lipoproteína de alta densidad
HIF α,β dímero α,β del factor inducible por hipoxia
IgG Inmunoglobulina
IRS-1 sustrato del receptor de insulina 1
JAK fosforilasas de la familia Janus
KRB medio salino Krebs-Ringer
LDL lipoproteína de baja densidad
Lep leptina
MAPK proteínas fosforilasas activadas por mitógenos

N₂ nitrógeno molecular
NAD⁺ nicotinamida adenín dinucleótido oxidado
NADH nicotinamida adenín dinucleótido reducido
NADP⁺ nicotinamida adenín dinucleótido fosfato oxidado
NADPH nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido
NaOH hidróxido de sodio
NMMA N^G-monometil-L-arginina
nNOS isoforma neuronal de la óxido nítrico sintasa
NO óxido nítrico
NO₂⁻ nitrito
NO₃²⁻ nitrato
NP nitroprusiato
NPY neuropéptido Y
O₂ oxígeno molecular
ob gen de leptina
Ob-Rb isoforma larga del receptor de leptina
Ob-Re isoforma soluble del receptor de leptina
PBS buffer fosfato salino
PL lactógeno placentaria
s/adiciones sin adiciones
SP Espermin-NONOato
STAT transductor de señales y activador de la transcripción
STZ estreptozotocina
TC tubo cardíaco
TD tubo digestivo
TLC cromatografía en capa delgada
TN tubo neural
UCP-1 y 2 proteínas desacoplantes 1 y 2
VLDL lipoproteína de muy baja densidad