

Tesis Doctoral

Agonistas de los PPAR como reguladores de anomalías fetales inducidas por la diabetes materna

Kurtz, Melisa Lidia Amelia

2016-03-07

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

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Kurtz, Melisa Lidia Amelia. (2016-03-07). Agonistas de los PPAR como reguladores de anomalías fetales inducidas por la diabetes materna. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Kurtz, Melisa Lidia Amelia. "Agonistas de los PPAR como reguladores de anomalías fetales inducidas por la diabetes materna". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-03-07.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

“ Agonistas de los PPAR como reguladores de anomalías fetales inducidas por la diabetes materna ”

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic Melisa Lidia Amelia Kurtz

Director de Tesis: Dra. Alicia Jawerbaum

Consejero de Estudios: Dra. Laura López

Lugar de trabajo: Laboratorio de Reproducción y Metabolismo- Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFYO), CONICET-UBA.

Buenos Aires, 2016

“Agonistas de los PPAR como reguladores de anomalías fetales inducidas por la diabetes materna ”

Resumen: En el presente trabajo se estudiaron anomalías en el corazón y el pulmón fetal en un modelo de diabetes moderada en rata y se evaluaron los efectos de la administración de agonistas de los receptores activados por proliferadores peroxisomales α y γ (PPAR α , PPAR γ) sobre dichas alteraciones.

En el corazón y el pulmón fetal de rata diabética se evidenció en forma sexo-dependiente, sobreacumulación de lípidos, disminución en la expresión de enzimas de oxidación lipídica, aumento en la producción de óxido nítrico (NO) y lipoperoxidos y disminución de la expresión de PPAR α y PPAR γ .

La administración intrafetal de agonistas de PPAR α (LTB₄) y PPAR γ (15dPGJ₂) hacia finales de la gestación o tratamientos maternos con dietas enriquecidas en ácidos grasos agonistas de los PPAR durante toda la preñez, mostraron regular varios parámetros alterados por la diabetes materna en corazón y pulmón fetal, entre ellos la anómala expresión de los PPAR y de enzimas y transportadores involucrados en el metabolismo lipídico, la sobreproducción de NO y el daño oxidativo a lípidos. Varios de los efectos de los agonistas de PPAR variaron de acuerdo al órgano y el sexo fetal. Además, los tratamientos dietarios mostraron efectos particulares de acuerdo al tipo de ácido graso suplementado en la dieta materna.

De esta forma se identificaron anomalías en el metabolismo de lípidos y marcadores de un estado pro-inflamatorio y pro-oxidante en corazones y pulmones fetales durante la gestación de rata diabética a término, que se vinculan con alteraciones en la expresión y función de los receptores nucleares PPAR. Estas anomalías podrían condicionar el desarrollo y función de dichos órganos teniendo consecuencias en la vida posnatal. A su vez, se describieron efectos benéficos de los agonistas de PPAR como moduladores de las alteraciones fetales provocadas por la diabetes materna.

Palabras claves: diabetes mellitus, gestación, pulmón, corazón, feto, PPAR α , PPAR γ , lípidos, óxido nítrico

“PPAR agonists as regulators of fetal anomalies induced by maternal diabetes”

Abstract: In this study, anomalies in the fetal heart and lungs were evaluated using a mild diabetes rat model. Moreover, the effects of administrating peroxisome proliferator activated receptor α and γ (PPAR α , PPAR γ) agonists on these alterations were evaluated.

Regarding the anomalies produced as a consequence of the maternal diabetes, in this study, fetal hearts and lungs from diabetic rats showed over-accumulation of lipids, reduced lipid oxidation enzymes expression, increased nitric oxide (NO) and lipoperoxides production and decreased expression of PPAR α and PPAR γ .

For studying the effects of PPAR agonists administration on these anomalies, two protocols were used, finding that the effect of the intrafetal administration of PPAR α and PPAR γ agonists (LTB₄ and 15dPGJ₂ respectively) at the end of pregnancy were similar to those observed when mothers received throughout pregnancy diets enriched in fatty acids capable of activating PPARs. Both protocols regulated those alterations induced by maternal diabetes in the fetal hearts and lungs; such as impaired expression of PPARs and enzymes/transporters involved in lipid metabolism, NO overproduction and lipid oxidative damage. The effects of PPAR agonists varied depending on the fetal sex or organ analyzed. Moreover, the effect of the maternal diet was related to the type of fatty acid enriched that it has.

Therefore, anomalies in the metabolism of lipids, pro-inflammatory and pro-oxidant state markers were here identified in fetal hearts and lungs as consequence of maternal diabetes in rats at term gestation. These anomalies were linked to alterations in the expression and function of PPAR; that may influence the development and functions of those organs, impacting on postnatal life. On the other hand, the beneficial effects of PPAR agonists on these alterations were also here described.

Keywords: diabetes mellitus, gestation, lung, heart, fetus, PPAR α , PPAR γ , lipids, nitric oxide

*Lucerito que guías mi caminito
iluminas el sendero hacia adentro y hacia afuera
tus ojitos cristalinos que me miran bien adentro
iluminas el camino abriendo el corazón...*

A Lucero y Pipa

Agradecimientos



Esta tesis es fruto del esfuerzo y participación de muchas personas que han aportado desde distintos lugares. A todos ellos quiero agradecer:

A mi directora de tesis, la Dra Alicia Jawerbaum por su esfuerzo y compromiso en la dirección de esta tesis, por transmitirme sus conocimientos y haberme guiado en este trabajo con paciencia y dedicación.

A mis compañeras de laboratorio Vero, Eva, Romi, Belén, Daiana y Sabrina por el tiempo compartido, sus enseñanzas y gran trabajo de equipo. A María, quien me subió a este barco, amiga que me acompañó dentro y fuera del laboratorio. A Nora por su compañerismo en el laboratorio, su ayuda, pero por sobre todo por la amistad que hemos construido a lo largo de estos años, por estar siempre.

A mis compañeros del CEFYBO, por su colaboración y predisposición. A Carlos Enzo y Marcela. A “las chicas del fondo” Guille, Pauli, Vale, Clau, Moni y Sabri.

A Eve, por su gran amistad, su colaboración y enorme paciencia. Por estar siempre dispuesta a ayudarme y escucharme.

A Bety y Umberto por su gran colaboración cuidando a Lu.

A mi mamá y mi papá, quienes me enseñaron el valor del esfuerzo y la perseverancia. Por confiar en mí y alentarme a seguir. Por su ayuda incondicional.

A Caro y Martín, Lau, Cami y Cande, Juli y Tincho por su gran apoyo y colaboración. A Conri, Berni, Lili y Mari, por alentarme siempre cerca o lejos. Por su amor fraternal.

A la hermosa familia que formé. A Pipa, por su amor, esfuerzo y comprensión, eligiendo caminar juntos día a día. A Lucero, la luz que me guía, que con su amor tan puro me señala el rumbo y me enseña las cosas importantes de la vida.

Índice



Introducción

<i>La diabetes mellitus</i>	1
Diabetes mellitus tipo 1	2
Diabetes mellitus tipo 2	3
Diabetes en la gestación	4
Modelos experimentales de diabetes	6
<i>El corazón</i>	9
Estructura y función	9
Desarrollo embrio-fetal del corazón	11
<i>Los pulmones</i>	15
Estructura y función	15
Desarrollo embrio-fetal del pulmón	16
<i>Alteraciones fetales en la gestación diabética</i>	22
<i>Los lípidos</i>	25
Estructura y función	25
Metabolismo lipídico en la gestación y sus alteraciones en la patología diabética	28
<i>Estrés oxidativo</i>	32
<i>El óxido nítrico</i>	37
Funciones biológicas del NO	38
Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la patología diabética	39
Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la gestación y efectos de la diabetes materna	40
<i>Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR)</i>	45
Estructura, mecanismo de acción y localización de los PPAR	45
PPAR α	48
PPAR γ	52
PPAR α y PPAR γ en el desarrollo fetal y placentario	54
Los PPAR en la gestación diabética	57

Hipótesis y Objetivos

<i>Hipótesis General</i>	61
<i>Hipótesis de trabajo</i>	61
<i>Objetivo General</i>	62
<i>Objetivos Específicos</i>	62

Materiales y Métodos

<i>Materiales</i>	64
Solventes soluciones y reactivos	64
Animales	65
Programas de análisis de imagen	65
Programas de análisis estadístico	66
<i>Metodología</i>	66
Modelo experimental de diabetes	66
Diseño experimental 1- Estudios en corazón y pulmón de fetos de rata diabética en el día 21 de gestación	67
Diseño experimental 2- Tratamientos <i>in vivo</i> con agonistas endógenos de los receptores PPAR α y PPAR γ en fetos de rata en la gestación a término	68
Diseño experimental 3 - Tratamientos dietarios a la rata gestante con alimento suplementado con aceites ricos en ácidos grasos agonistas de PPAR	70
<i>Determinaciones</i>	
Determinación de proteínas	72
Determinaciones plasmáticas	72
Determinación de los niveles de lípidos tisulares	73
Determinación de la composición porcentual de ácidos grasos tisulares	74
Determinación de los niveles de lipoperóxidos	75
Determinación de los niveles de nitratos/nitritos	76
Determinación de expresión génica de PPAR α , PPAR γ , ACO, CPT1, iNOS, FAS, FAT y ABCA1	76
Determinación de los niveles proteicos de PPAR α y PPAR γ	79
Análisis estadístico	80

Resultados

<i>CAPÍTULO I - Diabetes en la gestación: características del modelo experimental utilizado</i>	82
<i>CAPÍTULO II- Alteraciones en el corazón de fetos de rata diabética en la gestación a término</i>	85
Concentración de especies lipídicas en corazones de fetos macho y hembra de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación	86
Expresión génica de enzimas involucradas en la oxidación de lípidos en corazones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación	87
Producción de óxido nítrico y lipoperoxidación en corazones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación	89
Expresión génica de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en corazones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación	90
Expresión génica de PPAR α y PPAR γ en corazones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación	92
<i>CAPÍTULO III- Efecto del tratamiento in vivo con LTB₄, agonista de PPARα, en corazones de fetos de rata diabética en la gestación a término</i>	94
Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con LTB ₄ sobre parámetros plasmáticos, peso fetal y peso del corazón de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en la gestación a término	95
Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con LTB ₄ sobre la expresión génica de PPAR α en corazones de fetos hembra y macho en la gestación a término	97
Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con LTB ₄ sobre la expresión génica de ACO y CPT1 en corazones de fetos hembra y macho en la gestación a término	99
<i>CAPÍTULO IV- Efecto de dietas maternas enriquecidas en ácidos grasos agonistas de PPAR en corazones de fetos de rata diabética en la gestación a término</i>	102
Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre parámetros plasmáticos maternos y	

fetales y sobre el peso fetal y del corazón de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación	103
Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la concentración de lípidos en corazones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas	105
Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la expresión génica de PPAR α y PPAR γ en corazones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas	107
Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la expresión génica de ACO y CPT1 en corazones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas	110
Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la producción de NO y lipoperóxidos en corazones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas	112
<i>CAPÍTULO V- Alteraciones en pulmones de fetos de rata diabética en la gestación a término</i>	114
Concentración de especies lipídicas en pulmones de fetos macho y hembra de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación	115
Composición de ácidos grasos en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación	117
Expresión génica de enzimas involucradas en la oxidación de lípidos en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación	119
Producción de óxido nítrico y lipoperoxidación en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación	121
Expresión génica de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación	123
Expresión génica y niveles proteicos de PPAR α y PPAR γ en pulmones de fetos macho y hembra de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación	124
<i>CAPÍTULO VI- Efecto del tratamiento in vivo con LTB₄, agonista de PPARα en pulmones de fetos de rata diabética en la gestación a término</i>	130

Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con LTB ₄ sobre el peso de pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término	131
Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con LTB ₄ sobre la expresión génica de PPAR α en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término	132
Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con LTB ₄ sobre la expresión génica de ACO y CPT1 en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término	134
Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con LTB ₄ sobre la expresión génica de iNOS en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término	137
<i>CAPÍTULO VII- Efecto del tratamiento in vivo con 15dPGJ₂, agonista de PPARγ, en pulmones de fetos de rata diabética en la gestación a término</i>	139
Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con 15dPGJ ₂ sobre parámetros plasmáticos y peso fetal y peso del pulmón de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en la gestación a término	140
Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con 15dPGJ ₂ sobre la expresión génica de PPAR γ en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término	142
Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con 15dPGJ ₂ sobre la expresión génica de ACO y CPT1 en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término	143
Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con 15dPGJ ₂ sobre la expresión génica de iNOS en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término	146
<i>CAPÍTULO VIII - Efecto de dietas maternas enriquecidas en ácidos grasos agonistas de PPAR en pulmones de fetos rata diabética en la gestación a término</i>	148
Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre parámetros plasmáticos y peso fetal y peso del pulmón de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en la gestación a término	149
Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la concentración de lípidos en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas	150

Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la composición de ácidos grasos en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación	153
Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la expresión génica del transportador de ácidos grasos (FAT), la sintasa de ácidos grasos (FAS) y el transportador de colesterol ATP-binding cassette 1 (ABCA1) en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas	155
Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la expresión génica de PPAR α y PPAR γ en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas	158
Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la producción de NO y lipoperóxidos en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas	161

Discusión

<i>Discusión</i>	163
-------------------------	-----

Conclusiones

<i>Conclusiones</i>	184
----------------------------	-----

Referencias bibliográficas

<i>Referencias bibliográficas</i>	188
--	-----

Abreviaturas



- DM: diabetes mellitus
- DM1: diabetes mellitus tipo 1
- DM2: diabetes mellitus tipo 2
- DG: diabetes gestacional
- FFA: ácidos grasos libres
- PUFAS: ácidos grasos poliinsaturados
- LTB₄: Leucotrieno B₄
- 15dPGJ₂ : 15-Deoxi-Delta^{12,14}Prostaglandina J₂
- NF-κB: Factor nuclear kappa B
- NO: óxido nítrico
- iNOS: óxido nítrico sintasa inducible
- PPAR: receptores activados por proliferadores peroxisomales
- PPRE: elementos de respuesta a PPAR
- ROS: especies reactivas de oxígeno.
- RNS: especies reactivas del nitrógeno
- RXR: receptor del ácido 9-cis retinoico
- TBARS: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico
- ACO: Acil CoA oxidasa
- CPT1: carnitina palmitoiltransferasa 1
- FAS: Sintasa de ácidos grasos
- FAT: transportador de ácidos grasos
- ABCA1: cassette de unión a ATP 1
- NS: valor no significativo
- UR: unidades relativas

Introducción



La diabetes mellitus

La Organización Mundial de la Salud define a la diabetes mellitus como un desorden metabólico que se caracteriza por hiperglucemia crónica y trastornos del metabolismo de los carbohidratos, las grasas y las proteínas como consecuencia de una deficiente secreción o efecto de una hormona producida por el páncreas denominada insulina.

Según la Federación Internacional de Diabetes, la prevalencia promedio de la diabetes mellitus es aproximadamente 8% a nivel mundial, acentuándose en aquellas regiones de ingresos medios y bajos, clasificándose como una de las nuevas pandemias. Se estima que 1 de cada 12 personas tiene diabetes y que casi la mitad de ellas no fueron diagnosticadas. En el 2013 se calcula que nacieron 21 millones de niños afectados por la diabetes en la gestación. En el año 2014 se produjeron casi 5 millones de muertes vinculadas a la diabetes mellitus a nivel mundial. La prevalencia de esta enfermedad va en aumento por lo que se espera que dentro de 15 años afecte a más del 10% de la población (Federación Internacional de Diabetes 2013, Forouhi y Wareham 2014), siguiendo nuestro país la tendencia global.

El diagnóstico de esta patología se realiza mediante estudios sencillos de laboratorio cuyos criterios diagnósticos fuera del embarazo son: niveles basales de glucemia elevados (mayor a 126 mg/dl) y/o glucemia elevada (mayor a 200 mg/dl) luego de 2 horas de una ingesta de 75 gramos de glucosa o dosada en forma casual en dos oportunidades (Benzadon y col. 2014).

La Asociación Americana de Diabetes clasifica a esta patología en cuatro categorías generales de acuerdo a su etiología:

- 1- Diabetes Mellitus Tipo 1, producto de la destrucción de las células β pancreáticas, que conduce a una deficiencia en la secreción de insulina.
- 2- Diabetes Mellitus Tipo 2, producto de un defecto secretorio progresivo de la insulina en un entorno de insulinoresistencia.
- 3- Diabetes gestacional, aquella que cumple con los criterios diagnósticos en el embarazo.
- 4- Tipos específicos de diabetes originados por otras causas, como por ejemplo enfermedades del páncreas exocrino, alteraciones monogénicas (diabetes tipo MODY), o diabetes inducidas por fármacos (American Diabetes Association 2015).

Los tres primeros tipos son los más prevalentes en la población y en los cuales se explayará esta introducción, siendo la diabetes tipo 2 la que afecta al 85 % de las personas diagnosticadas con diabetes mellitus.

La patología diabética conduce a complicaciones multisistémicas, que incluyen retinopatía, nefropatía, neuropatía, enfermedades cardiovasculares periféricas, fallas cardíacas, accidentes cerebrovasculares, etc, que en conjunto aumentan la morbi-mortalidad, reduciendo la calidad y expectativa de vida así como también implica grandes costos en los sistemas de salud (Forouhi y Wareham 2014).

Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1)

Este tipo de diabetes, antiguamente llamada “insulino-dependiente” o “diabetes juvenil” afecta a aproximadamente 10% de los pacientes diabéticos y es causada por la destrucción de las células β pancreáticas mediada por células del sistema inmune, interviniendo en el desarrollo de esta patología tanto la susceptibilidad genética como factores ambientales. Generalmente esta patología aparece antes de los 20 años y es el tipo de diabetes más frecuente en niños, aunque también puede aparecer en la adultez. La primera manifestación de la enfermedad en niños y adolescentes suele ser cetoacidosis y puede ir acompañada de otros síntomas como polifagia, polidipsia y poliuria (American Diabetes Association 2015).

Se considera que la diabetes mellitus tipo 1 es una enfermedad en la que están involucrados varios genes. Se han descrito varios *loci* en diferentes cromosomas asociados a la susceptibilidad a la DM1. Muchos de estos *loci* también están relacionados con otras enfermedades autoinmunes. Aproximadamente el 45% de los pacientes presentan determinados haplotipos en la región que codifica para los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) del cromosoma 6, y en especial con los alelos HLA, DR y DQ (Dib y Gomes 2009).

Este tipo de diabetes se define en el 90-95% de los casos, por la presencia de al menos un marcador autoinmune, entre ellos autoanticuerpos contra islotes pancreáticos, autoanticuerpos contra insulina, autoanticuerpos contra decarboxilasa del ácido glutámico (GAD65), autoanticuerpos contra tirosinofosfatasa IA-2 e IA2b, o autoanticuerpos contra el transportador zinc 8 (ZnT8) (Canivell y Gomis 2014).

La deficiencia de insulina asociada a la DM1 es el resultado de la destrucción autoinmune de células β pancreáticas. Entre las causas se postula que infecciones virales podrían desencadenar en individuos susceptibles, la destrucción de esta población celular del páncreas, bajo la teoría del “mimetismo molecular”. Esta teoría se basa en la reactividad cruzada encontrada en múltiples enfermedades autoinmunes entre autoanticuerpos y epitopes de diversos agentes patógenos (Oldstone 1998). Algunos estudios han mostrado reactividad cruzada de autoanticuerpos encontrados en pacientes con DM1 y algunos virus como el hCMV (Roep y col. 2002) lo que llevaría, luego de la infección viral, la destrucción de las células β pancreáticas por medio de células T del sistema inmune.

Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2)

La DM2 es el tipo más frecuente de diabetes, se estima que lo padece entre el 90-95% de las personas diagnosticadas con diabetes mellitus. Antiguamente se la denominaba “diabetes insulino-dependiente” o “diabetes de la adultez”. Si bien la mayor parte de las personas que padecen DM2 son diagnosticadas en la adultez, la incidencia de este tipo de diabetes crece en la población adolescente y joven asociado al aumento en la prevalencia de la obesidad (Hannon y col. 2005).

El proceso fisiopatológico que subyace a la DM2, no es del todo claro, aunque hay identificados múltiples factores que conducen al desarrollo de esta patología.

La combinación de factores genéticos predisponentes con estilos de vida tales como el sedentarismo, las dietas hipergrasas, etc, son claves en el desarrollo de la enfermedad.

Como resultado, el paciente con DM2 presenta defectos en la sensibilidad y/o secreción de insulina. La insulinoresistencia encontrada en los pacientes con DM2 puede deberse a defectos en la vías de señalización intracelular y afectar la secreción de la insulina. Como consecuencia de la insulinoresistencia periférica, el páncreas secreta más insulina a fin de lograr la normoglucemia. Cuando dicha secreción es insuficiente se detecta hiperglucemia. Múltiples mediadores se vinculan al mecanismo de la insulinoresistencia incluidos los ácidos grasos no esterificados, citoquinas inflamatorias, adipoquinas, la disfunción mitocondrial, la glucotoxicidad y la lipotoxicidad, participando la formación amiloidea en la disfunción de las células β pancreáticas (Stumvoll *y col.* 2005, Del Prato 2009).

La sintomatología que presentan los pacientes con DM2 puede ser muy variada, aunque en muchos casos esta patología cursa de forma asintomática y el diagnóstico llega tardíamente ante la aparición de complicaciones propias de esta patología crónica.

Diabetes en la gestación

Cuando se habla de diabetes en la gestación se incluye a un grupo de mujeres que cursan embarazos con estados diabéticos de diversa etiología.

La pandemia de obesidad y DM2 en mujeres en edad reproductiva, resulta en un incremento en el número de mujeres que comienzan un embarazo con DM ya diagnosticada o que se diagnostica en el primer trimestre de la gestación. En cuanto al caso de mujeres que presentan diabetes pre-gestacional, estas pueden incluir a pacientes con DM1 o DM2 y corresponde al 10% de las mujeres embarazadas diabéticas (American Diabetes Association 2015). Tanto en la diabetes pre-gestacional como cuando la diabetes se diagnostica en el primer trimestre de gestación, se evidencia un aumento en la tasa de abortos espontáneos y malformaciones congénitas del embrión en desarrollo particularmente en el corazón, sistema nervioso, sistema urogenital, desarrollo musculo-esquelético entre otros. La elevadas concentraciones de glucosa a las que está expuesto el embrión y la consecuente glucotoxicidad, lleva a alterar complejas vías de

señalización a través de mecanismos moleculares que implican un aumento de las especies reactivas del oxígeno, disfunción mitocondrial y apoptosis (Jawerbaum y Gonzalez 2006, Reece 2012). Los efectos teratogénicos de la hiperglucemia están estrechamente vinculados al control metabólico de la mujer principalmente en el primer trimestre de la gestación, donde transcurren los eventos clave en la organogénesis embrionaria y su seguimiento médico y tratamiento pueden ser claves para reducir el impacto de la patología sobre el embrión en desarrollo (Kitzmilller y col. 2010).

Según recientes criterios diagnósticos de la Sociedad Argentina de Diabetes y la Asociación Latinoamericana de Diabetes, durante la gestación se diagnostica “diabetes” cuando la glucemia en ayunas es mayor a 126mg/dl en cualquier momento del embarazo, y “diabetes gestacional” (DG) cuando la glucemia es entre 100 y 126 mg/dl en cualquier momento del embarazo, o valores mayores a 140 mg/dl luego de la prueba de tolerancia a la glucosa (Lapertosa y col. 2014). Estudios de prevalencia en nuestro país indican que el 13% de las mujeres gestantes presentan DG (Sucani y col. 2014). Este tipo de diabetes resulta de una inadecuada respuesta a los procesos de adaptación metabólica que ocurren en la madre para satisfacer los requerimientos fetales, que se incrementan a partir del segundo trimestre de embarazo. En la gestación sana, a partir de las 24 semanas de embarazo, la mujer comienza a experimentar un estado de insulinoresistencia fisiológico inducido por hormonas placentarias, lo cual conduce a cambios metabólicos maternos que facilitan la disponibilidad de glucosa para el feto en desarrollo. Como consecuencia las células β pancreáticas maternas aumentan la secreción de insulina para compensar la insulinoresistencia de la gestación (Barbour y col. 2007). Así, los cambios en los niveles de glucemia a lo largo del embarazo son mínimos con respecto a los cambios de sensibilidad a la insulina de los tejidos maternos (Buchanan 2001). Cuando el páncreas materno no es capaz de secretar los altos niveles de insulina requeridos en este período de la gestación, se induce un estado diabético que se conoce como *diabetes gestacional*. Diversos mecanismos moleculares relacionados con la cascada de señalización de la insulina, entre otros, se vinculan con la anómala respuesta pancreática (Buchanan y col. 2007, Catalano 2014).

En la diabetes pre-gestacional, la tasa de malformaciones y abortos espontáneos es mayor que en la diabetes que se presenta sólo en el segundo y tercer trimestre, luego del período de organogénesis temprana en el que el embrión sufre los efectos teratogénicos de la hiperglucemia (Correa *y col.* 2008).

Tanto la diabetes pre-gestacional como la que se identifica en la gestación pueden generar adversas consecuencias para la salud de la madre y del feto. Estas complicaciones están ligadas al control metabólico materno y la transferencia de nutrientes al feto, y a la inducción de un entorno pro-oxidante y pro-inflamatorio a nivel intrauterino (Lappas *y col.* 2011). A corto plazo los hijos de madres diabéticas tienen una incrementada probabilidad de muerte perinatal, cardiopatías, retraso de crecimiento intrauterino, nacimiento pre-término, síndrome de distrés respiratorio, hipoglucemia neonatal, macrosomía, etc. Dependiendo del estado metabólico materno, el control y seguimiento durante el embarazo, el grado en que el feto se vea afectado será variable, observándose que las gestantes con mejor control metabólico tienen menor riesgo de sufrir las complicaciones antes mencionadas. A largo plazo se evidencian los efectos asociados a la programación intrauterina de diversas patologías que se pondrán de manifiesto en la vida adulta del neonato como obesidad, intolerancia a la glucosa, DM2, enfermedades cardiovasculares, hipertensión y dislipidemias (Aerts y Van Assche 2003, Durnwald y Landon 2013, Mitanchez *y col.* 2015).

Modelos experimentales de diabetes

Existen múltiples modelos de diabetes en distintas especies animales, cuyas características serán variables de acuerdo a cómo se logra el estado diabético en el animal y la severidad del cuadro diabético logrado (Jawerbaum y White 2010). Actualmente los animales más utilizados para estudiar la diabetes son la rata y el ratón, por razones éticas y por sus características de estandarización, obtención, mantenimiento, reproducción, ciclo de vida, etc. Los distintos modelos y sus variantes van a permitir simular las principales características de pacientes con DM1, DM2 o DG y de acuerdo al objetivo de estudio, será importante elegir adecuadamente un modelo que se ajuste a dicho objetivo.

Existen principalmente tres formas de obtener animales diabéticos: por métodos quirúrgicos, genéticos o químicos. El método quirúrgico, de antigua data,

consiste en la remoción del páncreas de forma total o parcial a través de una cirugía. Este modelo logra un animal con una insuficiente secreción de insulina, y los efectos diabetogénicos serán proporcionales al porcentaje de remoción del páncreas. Los métodos químicos logran el estado diabético del animal por la inducción de la muerte de las células β pancreáticas a través de la administración de drogas como el aloxano o la estreptozotocina (Rakieten y col. 1963a). De acuerdo a la dosis y esquema administración de dichas drogas, se lograrán diversos grados de hiperglucemia y consecuentes alteraciones metabólicas y funcionales en el animal (Junod y col. 1969). Otro modelo de diabetes en roedores incluye a cepas que espontáneamente desarrollan la patología debido a su background genético como es el caso de los ratones NOD, BB, Ob/Ob, db/db, por ejemplo y ratas Zucker, Cohen, GK entre otras (Rees y Alcolado 2005, Jawerbaum y White 2010).

Como se mencionó anteriormente la diabetes en la gestación, presenta múltiples riesgos y complicaciones para la madre y el feto, tales como abortos espontáneos, malformaciones, disfunción placentaria, alteraciones fetales, programación intrauterina de patologías en la descendencia, que pueden ser estudiados mediante el empleo de estos modelos animales y que en muchos casos, sin un modelo de diabetes experimental, sería imposible abordar.

Si se quiere estudiar los efectos de la diabetes en el período pre-implantatorio, de organogénesis embrionaria, de desarrollo feto-placentario o la descendencia de madre diabética se pueden utilizar distintos modelos experimentales que se adecúen a los propósitos de estudio (Jawerbaum y White 2010).

Uno de los modelos más utilizados y caracterizados por distintos grupos de trabajo, incluido el nuestro, para estudiar la diabetes en la gestación, es el obtenido a través de la administración de estreptozotocina en ratas.

La estreptozotocina es un antibiótico que se obtiene del *Streptomyces acharamogenes* (Rakieten y col. 1963b). La estreptozotocina es un compuesto que presenta en su estructura química una 2-deoxi glucosa en su cadena lateral. Dada su similitud con la glucosa se une con alta especificidad y afinidad a los receptores de glucosa en las células β pancreáticas e induce la muerte de dichas células. El mecanismo de acción de la estreptozotocina incluye la metilación del ADN

causando ruptura y alquilación de su estructura e induciendo a la enzima reparadora del ADN, la poliADP-ribosa-sintasa, a reparar dicha molécula. Esta enzima utiliza como cofactor el NAD⁺, la depleción de este compuesto en forma conjunta con la sobreproducción de agentes oxidativos y nitrativos, lleva a la muerte de las células β pancreáticas (Junod *y col.* 1967).

Si se administra estreptozotocina a la rata adulta, la droga destruye el páncreas endócrino, y se evidencian los efectos como hipoinsulinemia, hiperglucemia severa, cetoacidosis, polifagia, polidipsia, poliuria, fallas reproductivas que se manifiestan en alteraciones del ciclo estral, todas anomalías que podían ser semejantes a las que pueden ser encontradas en pacientes con DM1. En este modelo se encuentra reducida la concepción, la implantación, se inducen reabsorciones y malformaciones congénitas y la tasa de preñez a término es baja, con lo cual es un modelo para evaluar los efectos de la diabetes severa en la concepción, la implantación, los estadios tempranos de embriogénesis y organogénesis y el aborto espontáneo.

Otra variante del método químico con estreptozotocina en ratas que es compatible con la preñez a término y permite evaluar el desarrollo embrionario y fetal a lo largo de la gestación diabética, consiste en generar un modelo de diabetes moderada a través de la administración de estreptozotocina en forma subcutánea a neonatos hembra entre las 24 y 48 hs post-nacimiento (Portha *y col.* 1979). En la adultez y al momento de apareo, estas ratas presentan valores de glucemia entre 150 y 250 mg/dl. Este esquema de administración permite que la destrucción resultante del páncreas endócrino sea parcial, dada la capacidad del páncreas neonatal de recuperarse parcialmente por regeneración a partir de células indiferenciadas que aún se conservan en este período post-natal. Este modelo presenta glucemias levemente elevadas semejantes a las encontradas en gestantes diabéticas que cursan su embarazo de forma parcialmente controlada. Acompañando a la hiperglucemia moderada estos animales presentan insulinemia levemente disminuida y ausencia de cetoacidosis, además de anomalías reproductivas que han sido evidenciadas en el período de implantación, organogénesis y desarrollo feto-placentario (Jawerbaum y White 2010).

El corazón

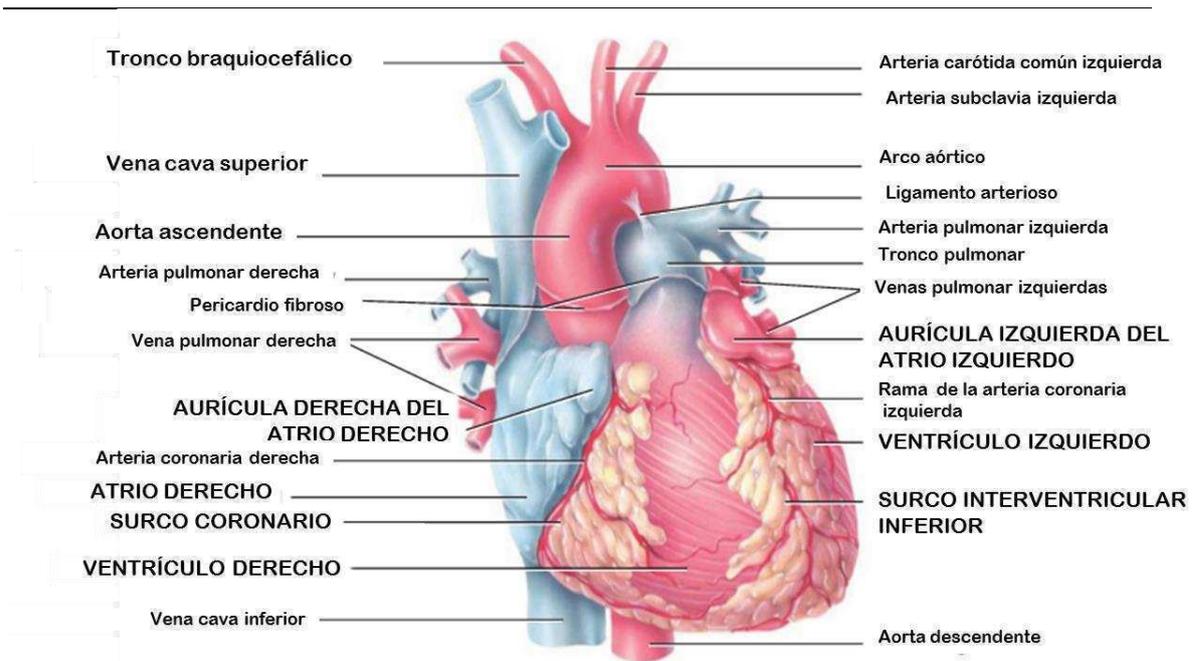
Estructura y función

El corazón de los mamíferos es un órgano muscular tetracavitario que funciona como doble bomba y genera el movimiento de la sangre dentro de un circuito circulatorio doble. Se localiza en el interior del tórax, en la región denominada mediastino, entre las dos cavidades pleurales. Este órgano tiene forma cónica cuyo vértice tiene orientación anteroinferior izquierda y la base posterosuperior.

Está rodeado por una membrana denominada pericardio, mientras que la pared del corazón está formada por tres capas, la externa corresponde al epicardio, la intermedia al miocardio y la interna al endocardio.

El corazón está formado por 4 cavidades: dos superiores, las aurículas y dos inferiores, los ventrículos. La aurícula derecha es una cavidad estrecha, de paredes delgadas, que forma el borde derecho del corazón y está separada de la aurícula izquierda por el tabique interauricular. Recibe sangre de la vena cava superior e inferior y del seno coronario. La sangre fluye de la aurícula derecha al ventrículo derecho por el orificio aurículoventricular derecho, donde se sitúa la válvula tricúspide. El ventrículo derecho es una cavidad alargada de paredes gruesas, que forma la cara anterior del corazón. El tabique interventricular lo separa del ventrículo izquierdo. El interior del ventrículo derecho presenta unas elevaciones musculares denominadas trabéculas carnosas. La sangre fluye del ventrículo derecho a través de la válvula semilunar pulmonar hacia el tronco de la arteria pulmonar. El tronco pulmonar se divide en arteria pulmonar derecha y arteria pulmonar izquierda. La aurícula izquierda es cavidad rectangular de paredes delgadas, que se sitúa por detrás de la aurícula derecha y forma la mayor parte de la base del corazón. Recibe sangre de los pulmones a través de las cuatro venas pulmonares, que se sitúan a la cara posterior, dos a cada lado. La sangre pasa de esta cavidad al ventrículo izquierdo a través del orificio aurículo-ventricular izquierdo, recubierto por la válvula mitral (o bicúspide). El ventrículo izquierdo constituye el vértice del corazón, su pared es gruesa y presenta trabéculas

carneas. La sangre fluye del ventrículo izquierdo a través de la válvula semilunar aórtica hacia la arteria aorta. El grosor de las paredes de las 4 cavidades varía en función de su acción. Las aurículas tienen unas paredes delgadas debido a que solo transfieren la sangre a los ventrículos adyacentes. El ventrículo derecho tiene una pared más delgada que el ventrículo izquierdo debido a que bombea la sangre a los pulmones, mientras que el ventrículo izquierdo la bombea a todo el organismo (Esquema 1).



Esquema 1. Anatomía externa del corazón adulto humano. Adaptado de (Tortora 2011).

El corazón está innervado por fibras nerviosas autónomas, tanto del sistema parasimpático como del sistema simpático, que forman el plexo cardíaco.

La irrigación sanguínea del corazón está a cargo de dos arterias coronarias principales, la arteria coronaria derecha y la arteria coronaria izquierda. Estas arterias se ramifican para poder distribuir la sangre oxigenada a través de todo el miocardio. La sangre desoxigenada es drenada por venas que desembocan el seno coronario, la cual desemboca en la aurícula derecha.

Cada latido cardíaco se produce gracias a la actividad eléctrica inherente y rítmica de algunas pocas fibras musculares miocárdicas, las fibras autorrítmicas o de conducción. Estas fibras son capaces de generar impulsos de una forma repetida y rítmica, y actúan como marcapasos estableciendo el ritmo de todo el corazón, y forman el sistema de conducción cardíaco. El sistema de conducción está formado

por el nódulo sinusal o nódulo sinoauricular, el nódulo auriculoventricular, el haz de His o fascículo auriculoventricular, el fascículo aurículoventricular y el plexo subendocárdico terminal o fibras de Purkinje.

Desarrollo embrio-fetal del corazón

El corazón es el primer órgano funcional en el embrión en desarrollo y el sistema circulatorio es la primera unidad funcional del organismo. El sistema cardiovascular comienza a desarrollarse en la tercera semana de gestación, ya que las necesidades del embrión no pueden satisfacerse a partir de la difusión desde y hacia la madre como lo hacía en forma temprana. Las células cardíacas progenitoras, dispuestas en el epiblasto migran a través de la línea primitiva, avanzando en dirección rostral, ubicándose en la capa visceral del mesodermo de la placa lateral a cada lado del cuerpo. El endodermo faríngeo subyacente induce la diferenciación de estas células en mioblastos cardíacos. A partir del mesodermo se diferencian islotes sanguíneos que formarán células sanguíneas y vasos por medio de vasculogénesis. Algunos islotes sanguíneos posteriormente se fusionan formando una estructura tubular con forma de herradura, que en su interior está revestida de endotelio y por fuera está rodeado de mioblastos, denominándose a esta estructura campo cardiogénico. Al mismo tiempo otros islotes sanguíneos cercanos formarán vasos denominados aortas dorsales.

Mientras el embrión se pliega en dirección antero-posterior, también lo hace lateralmente, lo cual conduce a la fusión caudal de los primordios cardíacos. De esta forma resulta un corazón tubular con revestimiento endotelial interno y por fuera una capa miocárdica. El miocardio segrega una gruesa capa de matriz extracelular que lo separará del endotelio. A su vez se diferencian células para formar una tercera capa que cubre la parte exterior del tubo: el epicardio. Esta capa externa formará además arterias coronarias (Esquema 2A).

El tubo cardíaco en desarrollo recibe drenaje venoso en su región caudal (seno venoso) y comienza a bombear sangre dentro de la aorta dorsal en la región craneal. La contractibilidad del tubo cardíaco, está dada por las pulsaciones cardíacas que comienzan mientras el par de primordios cardíacos se están fusionando. Las pulsaciones se hacen posible dada la presencia de bombas sodio-calcio en la membrana del miocardio. La ritmicidad de los latidos es coordinada

por el seno venoso y el impulso eléctrico aquí generado inicia ondas de contracción muscular a lo largo del tubo cardíaco lo que le permite bombear sangre antes de que esté completamente desarrollado el complejo sistema de válvulas del corazón (Gilbert 2006).

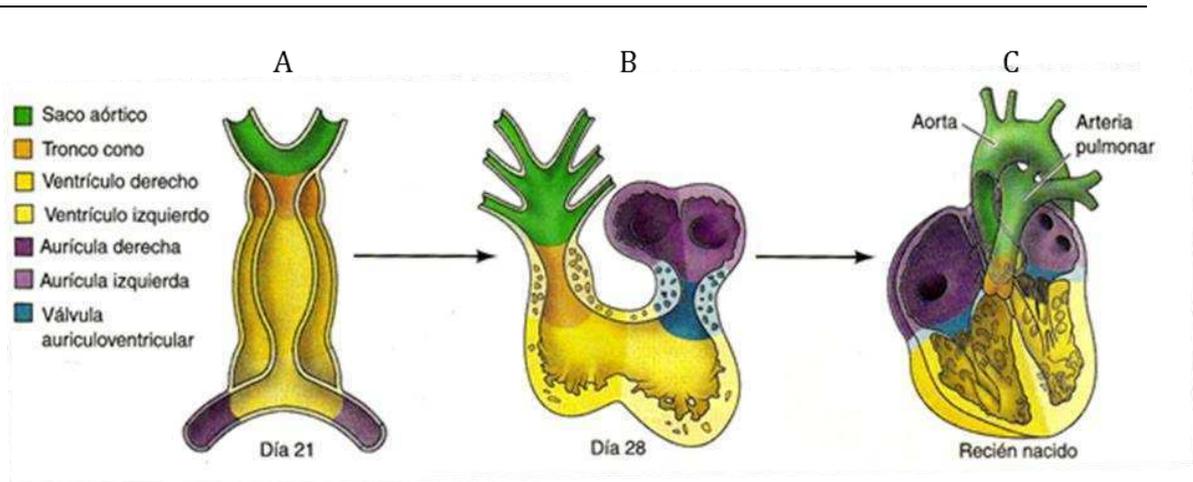
El tubo cardíaco entonces, constituye el corazón primitivo a partir del cual se va a formar el corazón desarrollado.

Hacia el día 23 de gestación, el tubo cardíaco que continúa alargándose, se curva y rota, creando un asa cardíaca que se completa hacia el día 28. A medida que se forma el asa cardíaca, se evidencian expansiones locales que diferenciarán regiones a lo largo del eje antero-posterior: seno venoso, aurícula primitiva, el ventrículo primitivo, el bulbo arterial (Esquema 2B). Estas regiones darán origen a regiones específicas del corazón desarrollado, a través de una serie de pasos que ocurren en el interior del corazón primitivo tales como la formación de septos interauriculares e interventriculares, formación del septo del tronco arterioso y el desarrollo de válvulas, para finalmente dar origen al corazón de cuatro cámaras.

Cuando está finalizando la formación del asa cardíaca comienzan a formarse trabéculas primitivas. El ventrículo primitivo trabeculado recibe ahora el nombre de ventrículo izquierdo primitivo. En el bulbo arterioso se diferenciará tres regiones: la proximal formará la porción trabeculada del ventrículo derecho, la parte media formará el cono arterial que dará origen a los infundíbulos ventriculares y la región distal denominada tronco arterial, formará las raíces y la parte proximal de la aorta y la arteria pulmonar.

Hacia el final de la cuarta semana y hasta la semana 14 aproximadamente el corazón del embrión sufre importantes modificaciones, que determinan el desarrollo del seno venoso con la incorporación del sistema venoso pulmonar y la separación de las cuatro cavidades cardíacas, además de la formación de las arterias aortas y pulmonar con sus respectivas válvulas.

El proceso de tabicamiento avanza más o menos en el sentido del flujo sanguíneo, inicialmente con la separación de ambas aurículas, proceso que se va sobreponiendo al tabicamiento del canal auriculoventricular y a la división de ambos ventrículos; finalmente el tabicamiento tronco conal permitirá la formación de la arteria aorta y del tronco pulmonar.



Esquema 2. Formación del asa y cámara cardíaca humana. **(A)** Hacia el día 21 de gestación el corazón es tubular. **(B)** hacia el día 28 se curva formando el asa cardíaca, situando la aurícula presuntiva anterior a los ventrículos presuntivos. **(C)** El recién nacido presenta un corazón tetracavitario, con válvulas y tabiques completos. Adaptado de (Gilbert 2006)

El tabicamiento resulta entonces en la formación del corazón fetal de cuatro cavidades desarrollado, con ciertas diferencias al corazón neonato, dado que cada uno de ellos vive en ambientes diferentes (Esquema 2C). En la vida intrauterina, el embrión no posee sus pulmones funcionales a la vez que recibe nutrientes y oxígeno a través de la circulación placentaria. Esta sangre llega embrión por medio de la vena umbilical que desemboca, a nivel hepático, en la vena cava inferior donde se mezcla la sangre oxigenada (proveniente de la placenta) y desoxigenada (proveniente de la cava inferior). Esta sangre mezclada llega a la aurícula derecha y allí se mezcla con la sangre proveniente de la cava superior. Como las aurículas están comunicadas por medio del foramen oval, parte de esta sangre pasa al ventrículo derecho y parte a la aurícula izquierda. De la aurícula izquierda pasa al ventrículo izquierdo y la sangre es bombeada a la aorta y de allí va a la circulación periférica para irrigar el cuerpo. La sangre que pasa al ventrículo derecho bombea la sangre hacia la arteria pulmonar. Dado que los pulmones no están desarrollados completamente y no son funcionales, un conducto temporal que sólo es funcional en la vida fetal, el ducto arterioso, redirecciona la mayor parte del flujo sanguíneo que sale del corazón por la arteria pulmonar, hacia la aorta, en vez de dirigirla a los pulmones. De esta manera el corazón funciona como una bomba de circulación en paralelo.

Al momento del nacimiento y consecuente exposición al medio aéreo e interrupción de la circulación placentaria, se producen varios cambios fisiológicos en el sistema circulatorio. Los pulmones se expanden y comienzan a ser funcionales. Se cierra el ducto arterioso por contracción de los músculos lisos, dando lugar a lo que se conoce como ligamiento arterial y de esta manera aumenta el flujo sanguíneo a la arteria pulmonar, que luego retornará al corazón por la vena pulmonar. Esto conduce al aumento de presión en el interior de la aurícula izquierda que llevará al cierre del foramen oval quedando completamente separadas aurícula izquierda y aurícula derecha. De esta manera el corazón funciona como una bomba de circulación en serie.

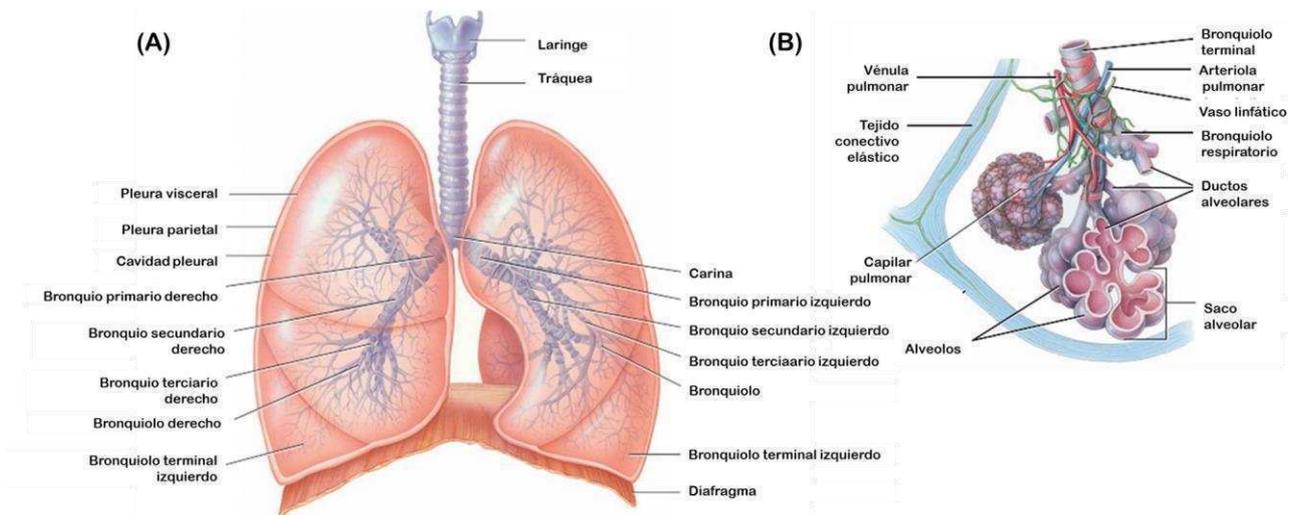
Cualquier falla en alguno de estos complejos mecanismos implicados en desarrollo del corazón y su adaptación neonatal, pueden provocar una anómala distribución sanguínea y/o una deficiente oxigenación, contribuyendo al aumento de la morbi-mortalidad fetal y neonatal y a la programación intrauterina de enfermedades cardiovasculares.

El estudio del desarrollo fetal del corazón se ha llevado a cabo desde hace décadas en diferentes animales, utilizando en sus orígenes el pollo como modelo experimental (Gilbert 2006). En la actualidad la mayoría de los estudios del desarrollo del corazón son llevados a cabo en modelos murinos. Las ratas son organismos modelo para estudios biomédicos, embriología cardíaca descriptiva y experimental y estudios teratogénicos ya que en la morfología embrionaria, fetal y post-natal de ratas existe una alta correlación con lo hallado en el desarrollo de ratones y humanos (Marcela y col. 2012).

Los pulmones

Estructura y función

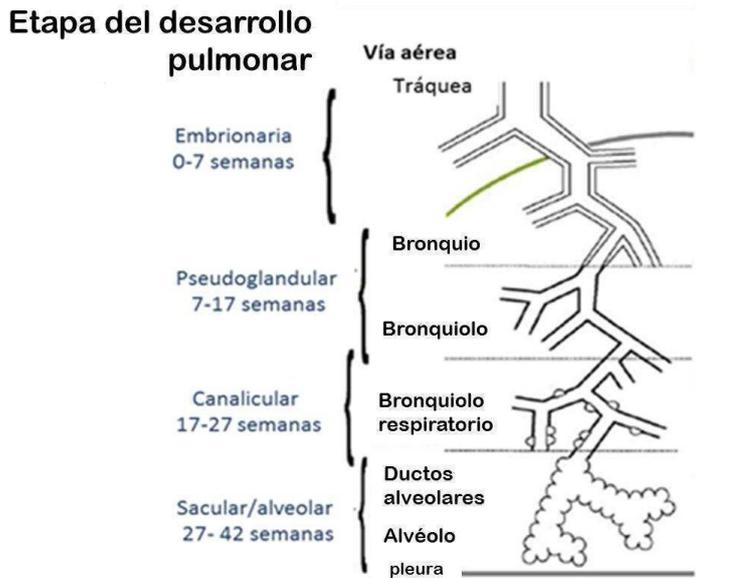
Los pulmones son órganos respiratorios ubicados en la cavidad torácica, a ambos lados del mediastino, rodeados por las cavidades pleurales. Los pulmones son los órganos encargados del intercambio de gases entre el organismo y el ambiente aéreo funcionando como bombas de aspiración bidireccional que mueven el aire por flujo y reflujo. Macroscópicamente se puede identificar que el pulmón derecho tiene tres lóbulos y dos fisuras, mientras que el pulmón izquierdo tiene dos lóbulos y una fisura. Los pulmones están comunicados al exterior por la tráquea, cuya entrada se produce por la glotis. El aire entra y sale a través de los bronquios principales, que son ramas de la tráquea y lo conduce finalmente hasta estructuras altamente especializadas, los alvéolos. Éstos son pequeños sacos terminales del árbol bronquial que tienen características morfológicas, celulares y bioquímicas particulares que permiten un eficiente intercambio de oxígeno y dióxido de carbono entre el organismo y su ambiente. Estas pequeñas terminaciones son muy numerosas, llegando a 300 millones en los pulmones de un adulto y su estructura globosa con presencia de septos genera una amplia superficie de intercambio (Esquema 3A). Los alveolos están formados principalmente por células alveolares de tipo I y de tipo II. Las células alveolares de tipo I participan en el intercambio gaseoso, mientras que las células alveolares de tipo II, producen una sustancia tensioactiva llamada surfactante pulmonar, compuesta por lípidos y en menor medida proteínas, que recubre la superficie alveolar de intercambio disminuyendo la tensión superficial del alveolo evitando que colapse en la espiración. Entre los alveolos hay una extensa red de capilares sanguíneos. La membrana alveolar forma una barrera alveolo-capilar a través de la cual se produce el intercambio gaseoso. Las arterias pulmonares conducen la sangre desoxigenada hacia los pulmones desde el ventrículo derecho del corazón y luego de la oxigenación en los alveolos pulmonares retorna a la aurícula izquierda a través de las venas pulmonares (Esquema 3B) (Kardong 2007).



Esquema 3. (A) Estructura del árbol bronquial y anatomía pulmonar. **(B)** Segmento broncopulmonar y circulación alveolar. Adaptado de (Tortora 2011)

Desarrollo embrio-fetal del pulmón

El desarrollo pulmonar en la vida intauterina comprende eventos dinámicos e interrelacionados a lo largo de toda la gestación. Los pulmones están entre los órganos que más tardíamente se diferencian por completo. Para describir el desarrollo pulmonar se han propuesto esquemáticamente cinco etapas, que se grafican en el esquema 4, a partir de los cambios morfológicos que sufre dicho órgano (Joshi y Kotecha 2007).

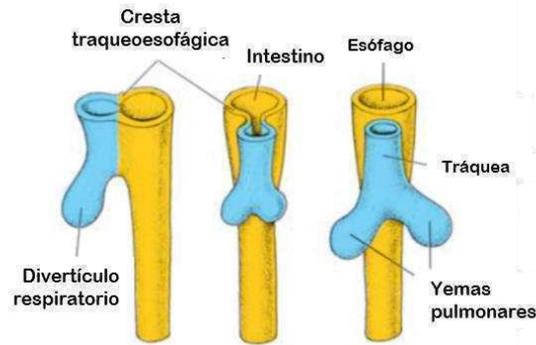


Esquema 4. Desarrollo esquemático del pulmón a lo largo de la gestación, en sus distintas etapas. Adaptado de (Hislop 2005).

Etapa embrionaria: 3-7 semanas:

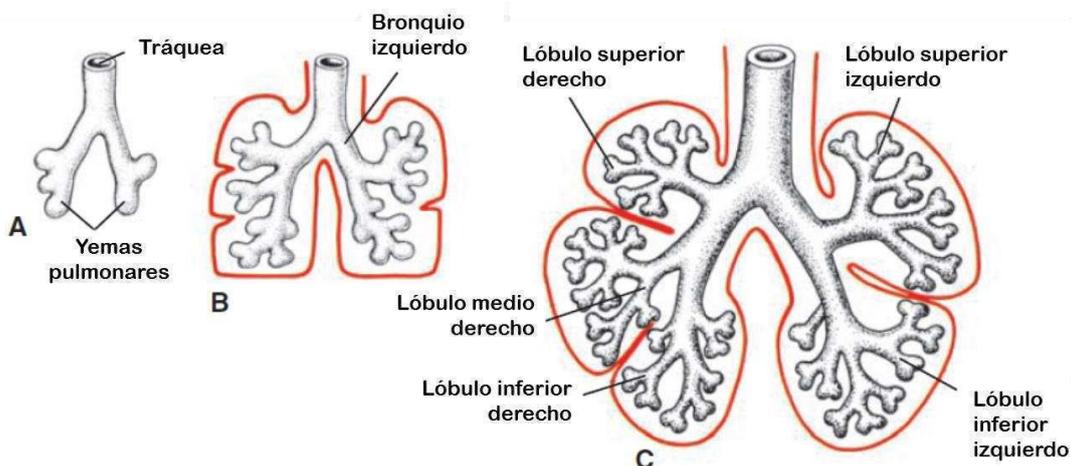
El sistema respiratorio humano comienza a desarrollarse a partir de las 3-4 semanas de gestación. En este momento en la pared ventral del intestino anterior aparece una yema pulmonar o divertículo respiratorio y su formación está dirigida por señales del mesodermo adyacente, que inducen no sólo su formación sino también su crecimiento y diferenciación (Esquema 5).

La yema pulmonar aparece a nivel del cuarto par de bolsas faríngeas y comienza a expandirse caudalmente mientras penetra en la mesénquima adyacente. En un principio, la yema se comunica con el intestino anterior, pero a medida que crece, se diferencian dos crestas traqueoesofágicas que se fusionan para formar el tabicamiento traqueoesofágico. Este tabicamiento da como resultado la separación de la porción de intestino que formará el esófago y ventralmente a él, la tráquea y las yemas pulmonares (Esquema 5).



Esquema 5. Diferenciación del divertículo respiratorio, fusión de crestas traqueoesofágicas y separación de la tráquea del esófago. Adaptado de (Langman y Sadler 2011).

Cerca de la quinta semana de desarrollo la yema pulmonar se divide en dos ramas, que van a formar los bronquios principales, uno hacia la porción derecha del embrión y otro hacia la izquierda. Posteriormente, el bronquio derecho se va a dividir en tres bronquios secundarios y el izquierdo dos. Las yemas en su crecimiento se van a expandir dentro de los canales pericardioperitoneales. Cuando dichos canales se separan de la cavidad pericárdica y peritoneal respectivamente, forman la cavidad pleural, dentro de la cual se expanden los pulmones en desarrollo (Esquema 6A) (Langman y Sadler 2011).



Esquema 6. Fases del desarrollo de la tráquea y los pulmones. (A) 5 semanas de gestación (B) 6 semanas de gestación (C) 8 semanas de gestación. Adaptado de (Langman y Sadler 2011)

Desde la cuarta semana y hasta la semana 16 se produce la vasculogénesis a partir de células mesenquimáticas que rodean a las yemas pulmonares, siendo las vías aéreas inductoras de este proceso. De esta manera los vasos sanguíneos se formarán en paralelo siguiendo el crecimiento de las vías aéreas (Hall y col. 2000).

Etapas pseudoglandular 7-17 semanas

La etapa pseudoglandular se caracteriza por las sucesivas divisiones dicotómicas de los bronquios secundarios para formar 10 bronquios terciarios en el pulmón derecho y 8 en el izquierdo (Esquema 6B y C). Para el sexto mes las sucesivas bifurcaciones produjeron 17 subdivisiones (Langman y Sadler 2011). Hacia el final de esta etapa se completó el número definitivo de bronquiolos terminales, formando las estructuras pre-acinares. A medida que transcurre este período el epitelio pseudoestratificado primario es remplazado por células columnares en la región proximal y por células cúbicas en la porción distal. Estas últimas son las que posteriormente darán origen a las células alveolares de tipo II (Joshi y Kotecha 2007).

En este período la vasculatura se ramifica a la par de las vías aéreas, en tanto se ramifica un brote y crece en la mesénquima, se desarrolla un plexo capilar que lo rodea, para unirse luego a los vasos preexistentes, y formar así redes de vasos arteriales y venosos (Hislop 2005).

Etapas canalicular 17-27 semanas

A partir de los bronquiolos terminales se formarán las estructuras acinares compuestas por bronquiolos respiratorios, ductos alveolares y alvéolos rudimentarios en forma de sacos. El epitelio cúbico se diferencia y los ductos alveolares están recubiertos por células alveolares de tipo II, que darán origen a las células alveolares de tipo I, que recubrirán los sacos distales (Joshi y Kotecha 2007). Otro evento importante en esta etapa es la formación de la barrera alvéolo-capilar, que consiste en el adelgazamiento del epitelio de los sacos terminales y aproximación a los capilares circundantes, lo que permitirá el intercambio gaseoso (Hislop 2005).

En la semana 24 comienza la producción de surfactante pulmonar en las células alveolares de tipo II. El surfactante es una mezcla de proteínas y fosfolípidos, que secreta esta población celular, que recubrirá los alvéolos y permitirá el intercambio gaseoso en la vida extrauterina. Este surfactante

disminuye la tensión de la superficie alvéolo-aire, lo cual evita que el alvéolo colapse durante la expiración. La mezcla de lípidos surfactantes, implica una compleja y específica maquinaria metabólica de las células alveolares de tipo II, para producir en adecuadas proporciones los distintos lípidos, principalmente fosfatidilcolina disaturada (Rooney y col. 1994).

La adecuada producción de surfactante es vital para la vida del neonato. Aquellos niños prematuros que no poseen, por su edad gestacional o patologías asociadas a la gestación, adecuado y/o suficiente surfactante pulmonar tienen mayor riesgo de padecer síndrome de distrés respiratorio al nacimiento (Lane y col. 2002).

Etapa sacular 28-36 semanas

En esta etapa continúa el crecimiento de las vías aéreas periféricas, por división y formación de sacos terminales, lo que aumenta la superficie de intercambio gaseoso. La pared continúa adelgazándose y forma septos primarios. Comienzan a depositarse fibras elásticas donde surgirán los septos secundarios. Aumenta la producción de surfactante y la diferenciación de células alveolares de tipo II a tipo I. Los alvéolos comienzan a desarrollarse hacia la semana 30 y junto a ellos pequeños vasos sanguíneos.

Etapa alveolar 36 semanas- 2 años post-natal.

En esta etapa comienzan a formarse tabiques por depósito de fibras elásticas en las paredes saculares, de forma que los dividen de forma incompleta en unidades menores, los alvéolos. A medida que se forman nuevos alvéolos se forman nuevos capilares por angiogénesis.

Se observa aumento en la proliferación de todos los tipos celulares, y se incrementa el tamaño de los vasos sanguíneos proximales para satisfacer la demanda del tejido en crecimiento. En esta etapa continúa el aumento de la producción de surfactante pulmonar.

Estos procesos resultan en un incremento exponencial de la superficie de intercambio gaseoso y preparación para la vida extrauterina (Joshi y Kotecha 2007).

El desarrollo pulmonar es un proceso altamente coordinado y complejo, sobre el cual aún se desconocen muchos mecanismos. El crecimiento, diferenciación y maduración adecuados permitirán la eficaz adaptación del feto al medio aéreo tras el nacimiento. Defectos en el desarrollo, así como en la maduración y la producción del surfactante pulmonar elevan los índices de morbi-mortalidad por colapsos respiratorios e inadecuado intercambio gaseoso en la vida neonatal, así como también predisponen el desarrollo de patologías pulmonares en la adultez (Shi y col. 2007).

Para estudios del desarrollo fetal de los pulmones se han utilizado diversos animales experimentales como conejo, oveja, rata y ratón. En la actualidad los modelos murinos son los más difundidos. En los diversos modelos animales, en general se reconocen las mismas etapas que se describen en el desarrollo fetal humano. Sin embargo pueden apreciarse diferencias en cuanto al porcentaje de la gestación que ocupa cada etapa. Si bien en la rata, la etapa alveolar comienza en la vida post-natal, a diferencia del pulmón humano que está establecida hacia la semana 36, el pulmón fetal de rata a término, cumple las funciones en forma similar al pulmón humano (Pringle 1986, Lock y col. 2013).

Alteraciones fetales en la gestación diabética

La diabetes materna altera el desarrollo embrionario y fetal, teniendo consecuencias en la estructura y función de diferentes órganos. Estas alteraciones conducen a un aumento en la morbi-mortalidad del neonato, así como también se evidencian sus efectos en la vida adulta bajo mecanismos alterados de la programación intrauterina (Simeoni y Barker 2009, Mitanhez *y col.* 2014).

La exposición a un entorno diabético en el primer trimestre de gestación, período en el que transcurren la implantación y organogénesis temprana, conduce a un aumento de la tasa de abortos espontáneos y malformaciones embrionarias, alteraciones descritas tanto en humanos como en modelos experimentales de diabetes (Eriksson 2009, Reece 2012)

Son múltiples los mecanismos teratogénicos producto del exceso de sustratos metabólicos maternos, propio de la patología diabética, que incluyen una serie de eventos interrelacionados como alteraciones metabólicas, inducción de un entorno pro-inflamatorio, aumento de las especies reactivas del oxígeno e inducción de la muerte celular programada (Reece 2012, Higa y Jawerbaum 2013). Continuando con el desarrollo, diversos estudios han mostrado que la diabetes en la gestación se relaciona con una incrementada producción de especies reactivas del oxígeno y/o una disminuida capacidad antioxidante en la placenta y en el feto evidenciando que el desarrollo ocurre en un entorno pro-oxidante (Pustovrh *y col.* 2005b, Jawerbaum y Gonzalez 2006, Grissa *y col.* 2007, Ornoy 2007).

Una de las complicaciones fetales más frecuentes de la gestación diabética es la macrosomía (Mitanhez 2010). Durante el segundo y tercer trimestre de embarazo, los cambios hormonales propios de la gestación, sumados a la hiperglucemia y la dislipemia características de la patología diabética, incrementan el transporte de distintos sustratos metabólicos hacia el feto (Herrera y Ortega-Senovilla 2014). Se han encontrado alteraciones en la expresión de diferentes genes que participan en el metabolismo de los lípidos y la glucosa en la placenta de pacientes diabéticas, que podrían contribuir a un aumento en la transferencia de nutrientes hacia el feto en desarrollo (Radaelli *y col.* 2009, Higa y Jawerbaum

2013). En conjunto, anomalías metabólicas maternas y placentarias conducen a un aumento de la glucemia fetal y consecuente incremento en la producción de insulina fetal. De esta forma se genera un estado anabólico en el feto con un consecuente desarrollo de fenotipo macrosómico con una aumentada masa adiposa (Catalano *y col.* 2003, Schaefer-Graf *y col.* 2008). Esto no sólo tiene consecuencias sobre el neonato, sino que también juega un papel importante en la “memoria metabólica” conduciendo a una alterada programación intrauterina que se vincula al desarrollo de patologías como la obesidad y diabetes en la vida adulta (Schaefer-Graf *y col.* 2005, Ornoy 2011, Higa y Jawerbaum 2013).

Diversos órganos fetales son afectados por la diabetes materna, cuya función se ve comprometida a corto y/o largo plazo.

En modelos experimentales de diabetes se ha encontrado que los fetos presentan acumulación de lípidos en el hígado, daño hepático y esteatosis vascular hepática vinculado al aumento de sustratos metabólicos, de las ROS y de la apoptosis (Martinez *y col.* 2011b, El-Sayyad *y col.* 2014). Diversos trabajos señalan alterada función renal (Yan *y col.* 2014) y defectos en la estructura y función pancreática (Fowden y Hill 2001) en fetos de animales diabéticos.

Dentro de las alteraciones fetales más frecuentes asociadas a la diabetes en la gestación se encuentran una serie amplia de defectos de estructura y función cardiovascular, tanto en humanos como en modelos animales (Corrigan *y col.* 2009).

La cardiomiopatía hipertrófica neonatal es uno de los trastornos con mayor prevalencia en la gestación diabética, que puede causar cardiomegalia, menor distensibilidad del miocardio, aumentar la presión y afectar el flujo sanguíneo (Zielinsky y Piccoli 2012).

Neonatos que se desarrollaron en un entorno diabético tienen mayores alteraciones como retraso en el cierre del ducto arterioso, hipertrofia del septum ventricular, engrosamiento del miocardio y electrocardiogramas anormales (Passarella *y col.* 2013). A su vez se han asociado alterados parámetros funcionales del corazón de los neonatos a la gestación diabética (Pauliks 2015).

Estudios en modelos animales de diabetes evidencian alteraciones en el arco aórtico fetal, malformaciones congénitas como tetralogía de Fallot, asociados en algunos casos al aumento de la apoptosis (Molin *y col.* 2004), así como también

malformaciones en arterias coronarias, cuyas causas estarían vinculadas al aumento de las ROS (Moazzen y col 2015).

El pulmón fetal es otro órgano que se ve afectado en la gestación diabética. Tanto en humanos como en modelos experimentales de diabetes se han descrito diversas alteraciones en este órgano atribuibles al entorno diabético en el cual se desarrolla el feto. La diabetes materna afecta al normal desarrollo pulmonar fetal a través de alteraciones estructurales del pulmón (Koskinen y col. 2012), retraso en la maduración pulmonar (Piper 2002) y anómala síntesis lipídica y expresión de proteínas que componen el surfactante (Trevino-Alanis y col. 2009, Lock y col. 2013). En neonatos de rata diabética se encontró un estado pro-oxidante en diversos órganos, entre ellos el pulmón, que incluía un aumento en los lipoperóxidos y una disminuida actividad de enzimas antioxidantes (Kinalski y col. 2000). Estas podrían ser algunas de las causas que subyacen a las complicaciones que sufren los neonatos de madres diabéticas, entre las cuales cabe mencionar distrés respiratorio fetal, asfixia perinatal y fallas en la adaptación cardiopulmonar neonatal (Vela-Huerta y col. 2007, Koskinen y col. 2011, Milla y Zirbes 2012).

Son múltiples las anomalías fetales inducidas por la diabetes materna y aún desconocidos muchos de los mecanismos involucrados en dichas alteraciones. Esto hace imprescindible investigar los orígenes y mecanismos afectados en el feto por la diabetes materna a fin de desarrollar estrategias terapéuticas que minimicen el impacto de la patología diabética durante la gestación, sobre el feto, el neonato y su vida adulta.

Los lípidos

Estructura y función

Los lípidos son un amplio conjunto de biomoléculas cuya característica definitoria de grupo es su naturaleza hidrofóbica o anfipática y su solubilidad en solventes orgánicos.

Las funciones biológicas de los lípidos son diversas e incluyen almacenamiento energético, constituyente estructural de membranas celulares, cofactores enzimáticos, agentes emulsionantes, hormonas, vitaminas y mensajeros intracelulares (Lehninger 2005).

Ácidos grasos:

Los ácidos grasos son moléculas constituidas por una cadena hidrocarbonada unida a un grupo carboxilo terminal. Son de naturaleza anfipática ya que la cadena hidrocarbonada es hidrofóbica, mientras que el grupo carboxilo, polar, es hidrofílico.

Su biosíntesis está dada por la elongación del precursor malonilCoA (que se forma enzimáticamente a partir de acetilCoA) por medio de sucesiones de cuatro reacciones llevadas a cabo por la sintasa de ácidos grasos que adiciona al malonilCoA una unidad de acetilo y sucesivos malonilos. Estas reacciones ocurren en el citoplasma, con requerimiento de cofactores y energía, hasta que la molécula posee 16 carbonos (ácido palmítico) y luego es transportado al retículo endoplasmático donde pueden, a partir de este ácido graso, sintetizarse otros ácidos grasos de mayor longitud.

En los animales las cadenas hidrocarbonadas que forman los ácidos grasos pueden contener de 4 a 36 átomos de carbono, siempre siendo números par. Estas cadenas hidrocarbonadas pueden presentar todos enlaces carbono-carbono simples o algunos enlaces dobles. Si posee todos sus enlaces simples, se trata de ácidos grasos saturados, si posee un doble enlace, es un ácido graso monoinsaturado y si posee múltiples dobles enlaces, se trata de un ácido graso poliinsaturado (PUFA). En los PUFA, de acuerdo a la posición que toma el primer

doble enlace en la cadena hidrocarbonada respecto del grupo metilo, se los puede clasificar en omega-3 (n3), omega-6 (n6) y omega-9 (n9) cuando el doble enlace está en el carbono 3, 6 o 9 respectivamente. Casi todos los dobles enlaces en ácidos grasos de cadena larga insaturados presentes de manera natural están en la configuración *cis*.

El ser humano produce diversos ácidos grasos, pero hay algunos que deben ser incorporados a partir de la dieta ya que carece de las enzimas necesarias para su síntesis. Se trata de ácidos grasos de la serie omega-3 y omega-6, denominados ácidos grasos esenciales. Los ácidos grasos omega-9 no son esenciales, ya que pueden ser sintetizados en el organismo a través de una insaturación en esa posición. En cambio, se consideran esenciales los ácidos grasos omega-3 (C18:3, ácido alfa-linolénico) y omega-6 (C18:2, ácido linoleico), ya que el organismo no puede introducir insaturaciones en dichas posiciones. Es por ello que la dieta debe contener estos ácidos grasos en cantidades adecuadas, según las recomendaciones actuales, porque su carencia o desequilibrio en la ingesta puede producir diversas alteraciones. Las principales fuentes dietarias de ácido linoleico (n-6) son aceites vegetales tales como el aceite de maíz, cártamo y girasol (Gurr y col. 2002). El ácido alfa-linolénico (n-3) se encuentra principalmente en el aceite de canola y soja y en semillas y aceite de chía.

Para ciertas funciones metabólicas y estructurales el organismo requiere ácidos grasos poliinsaturados de mayor número de carbonos. Dichos ácidos grasos se denominan ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) y son sintetizados a partir de ácidos grasos precursores de la serie omega-6 u omega-3, que sufren procesos de elongación y de desaturación en el hígado. Así el ácido linoleico puede dar origen al ácido araquidónico (C20:4, omega-6, AA), y del mismo modo, el ácido linolénico da origen al ácido eicosapentaenoico (C20:5, omega-3, EPA) y al ácido docosahexaenoico (C22:6, omega-3, DHA). Son también importantes las contribuciones dietarias de estos ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, presentes principalmente en pescados (Williams y Burdige 2006). Todos estos LC-PUFA tienen funciones metabólicas y reguladoras claves en diferentes tejidos.

Triglicéridos:

Los triglicéridos están constituidos por tres ácidos grasos unidos por enlace éster a una molécula de glicerol. Si los ácidos grasos que lo componen son iguales, se trata de un triglicérido simple. La mayoría de los triglicéridos naturales son mixtos, es decir que contienen dos o más ácidos grasos diferentes.

Los triglicéridos son de naturaleza apolar, hidrofóbicos y prácticamente insolubles en agua, dado que los hidroxilos polares del glicerol y los carboxilos polares de los ácidos grasos están unidos por enlaces éster. Es por ello que deben ser transportados por lipoproteínas (quilomicrones, HDL, LDL, VLDL) y son almacenados en forma de gotas lipídicas, principalmente en adipocitos.

La principal función de los triglicéridos es la de reserva energética y su oxidación proporciona más del doble de energía, gramo por gramo, que la de los glúcidos. En el catabolismo de los triglicéridos actúan enzimas específicas, denominadas lipasas, que hidrolizan el enlace éster, liberando los ácidos grasos (Lehninger 2005).

Colesterol:

El colesterol es el principal esteroide en tejidos animales. Es anfipático, con el grupo polar hidroxilo en C-3 y un cuerpo hidrocarbonado apolar formado por el núcleo esteroideo y la cadena lateral hidrocarbonada en C-17. El núcleo esteroideo consiste en cuatro anillos fusionados, tres de ellos con seis carbonos y uno con cinco. El núcleo esteroideo es casi plano y relativamente rígido. Dado que es prácticamente insoluble en agua, es almacenado en forma de gotas lipídicas y es transportado en circulación a través de lipoproteínas.

Cumple importantes funciones biológicas como modular la fluidez y permeabilidad de las membranas biológicas y actuar como precursor para la síntesis de hormonas esteroideas y de los ácidos biliares (Lehninger 2005).

Ésteres de colesterol:

Los ésteres de colesterol son ácidos grasos esterificados con una molécula de colesterol. Son componentes estructurales de las membranas biológicas, reservorios de ácidos grasos y de colesterol.

Metabolismo lipídico en la gestación y sus alteraciones en la patología diabética.

Los lípidos juegan un papel fundamental durante el desarrollo embrionario y fetal y presentan diversos cambios fisiológicos en su metabolismo conforme avanza la gestación.

En la primera mitad del embarazo prevalece el metabolismo anabólico que se evidencia en la acumulación de lípidos en tejidos maternos como resultado de la hiperfagia y la sensibilidad a la insulina normal o incrementada. Estos cambios conducen a modificaciones en el metabolismo del tejido adiposo: la insulina incrementa la incorporación de glucosa, y aumenta la actividad de la enzima lipoprotein lipasa incrementando la incorporación de ácidos grasos que se acumulan como triglicéridos. A su vez la insulina disminuye la actividad lipolítica en los adipocitos (Herrera y Ortega-Senovilla 2010).

En el tercer trimestre de gestación, en cambio, predomina el metabolismo catabólico. La gestación se caracteriza por un estado de insulinoresistencia fisiológica, principalmente desde la semana 24 y hasta el final del embarazo. La glucemia basal va disminuyendo conforme avanza el embarazo y en el tercer trimestre debido principalmente al paso transplacentario y utilización fetoplacentaria de la glucosa (Lain y Catalano 2007). En una mujer gestante sana la sensibilidad a la insulina se encuentra reducida en un 10% y este efecto está dado por la acción de diversos mediadores como la somatotrofina coriónica humana, estrógenos, progesterona, prolactina, cortisol y factor de necrosis tumoral alfa. Estos cambios son necesarios para la movilización de depósitos lipídicos de la madre con el fin de suplir las necesidades maternas y fetales. De esta manera aumenta la lipólisis, disminuye la acumulación de grasa y consecuentemente aumentan los niveles de ácidos grasos no esterificados en plasma (Herrera y col. 2006).

La mayor parte de los lípidos fetales proviene de los aportes maternos y en menor proporción de la biosíntesis fetal. El aporte materno adecuado es fundamental para el desarrollo fetal, en particular de aquellos ácidos grasos esenciales y ácidos grasos de cadena larga (LC-PUFA) que no produce la madre ni el feto (Poniedziałek-Czajkowska y col. 2014).

A diferencia de la transferencia de glucosa, los lípidos no atraviesan la placenta directamente. La mayor parte de los ácidos grasos maternos circulan en forma de ácidos grasos esterificados, asociados principalmente a lipoproteínas y en menor medida como ácidos grasos libres. La transferencia placentaria de lípidos es un proceso complejo que incluye receptores para ácidos grasos que circulan libres o asociados a proteínas plasmáticas y receptores para lipoproteínas que captan lipoproteínas circulantes maternas. En el proceso de transferencia participan también diferentes lipasas (lipoproteinlipasa, fosfolipasa A2 y lipasas intracelulares) y proteínas transportadoras que permiten la liberación y transferencia de los ácidos grasos al feto (Herrera y Ortega-Senovilla 2014).

En el embrión y el feto, los ácidos grasos actúan en múltiples mecanismos con funciones estructurales y como precursores de moléculas bioactivas involucradas en vías de señalización celular (Haggarty 2010). Los ácidos grasos poliinsaturados son precursores de diversos grupos de biomoléculas como los eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos) que se sintetizan por sus respectivas vías enzimáticas a partir del ácido araquidónico. Se han descrito ampliamente sus múltiples funciones, entre ellas las vinculadas con procesos reproductivos (Khan *y col.* 2008, Salleh 2014). La deficiencia de PUFAs y sus derivados se asocia a anomalías del desarrollo, por ejemplo visual y nervioso (Innis 2007, Higa y Jawerbaum 2013).

El colesterol, lípido fundamental para la biosíntesis de hormonas esteroideas y la formación de membranas celulares, es altamente requerido por el embrión y el feto en desarrollo, principalmente hacia fines de la gestación. Si bien existe transporte placentario, una alta proporción de colesterol es sintetizado por el hígado y cerebro fetal.

La disponibilidad de sustratos metabólicos en el feto depende de su concentración en la circulación materna y la transferencia a través de la placenta. Alteraciones en el metabolismo materno y/o en la transferencia placentaria de dichos sustratos metabólicos puede conducir a una amplia gama de alteraciones feto-placentarias, tal como sucede en gestaciones que cursan con diabetes u obesidad (Higa y Jawerbaum 2013)

La mujer gestante diabética presenta frecuentemente hiperglucemia e hipertrigliceridemia, asociada a la aumentada insulinoresistencia (la sensibilidad

a la insulina se encuentra reducida hasta en un 40 %). Es por ello que suelen encontrarse incrementados los niveles de triglicéridos séricos en los tres trimestres de gestación en comparación con gestantes sanas y su magnitud dependerá del tipo de diabetes, el grado de resistencia insulínica y del control metabólico, entre otros factores (Ferriols *y col.* 2015)

Durante la gestación diabética se ve alterado el transporte placentario tanto de macro como de micro-nutrientes y el anómalo perfil lipídico materno puede afectar la cantidad y/o calidad de los lípidos que se transfieren al feto (Araujo *y col.* 2015). La placenta de mujer diabética es incapaz de evitar la elevada transferencia de lípidos hacia el feto, afectada a su vez por alteraciones estructurales y funcionales (Desoye y Shafrir 1994). Los elevados niveles de triglicéridos maternos se correlacionan con la macrosomía, el elevado peso fetal y el incremento del tejido adiposo (Schaefer-Graf *y col.* 2008). El feto adquiere el fenotipo macrosómico hacia finales de la gestación como consecuencia de la hiperinsulinemia fetal en respuesta a los elevados niveles de glucosa que transfiere la madre, sumado al mayor aporte de lípidos desde la circulación materna (Schwartz y Teramo 2000, Cetin 2005). En modelos experimentales de diabetes se ha descrito placentomegalia, macrosomía, organomegalia, así como también acumulación de lípidos en la placenta y diversos órganos fetales (White *y col.* 2004, Martinez *y col.* 2008, White *y col.* 2015)

Por otro lado, la exacerbada transferencia de sustratos metabólicos de la madre diabética al feto y su posterior oxidación conduce a un incremento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y al desarrollo de un entorno pro-inflamatorio. Estas ROS ejercen efectos teratogénicos a nivel embrionario y fetal a través múltiples vías que incluyen daño a biomoléculas activas, alteración de señalización celular, desregulación de la expresión génica y anómala apoptosis (Zabihi y Loeken 2010, Lappas *y col.* 2011, Zhao y Reece 2013).

Durante la gestación diabética, se han descrito anómalos niveles PUFA de la serie n-3 y n-6 en la circulación materna y la deficiencia de ciertos eicosanoides en placentas y fetos de madre diabética. Este desbalance se vincula con alteraciones en las enzimas de síntesis de eicosanoides o con daño oxidativo a lípidos dado el entorno pro-oxidante propio de la patología diabética (Brenner 2003, Jawerbaum y Gonzalez 2005). El desbalance en los niveles de prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos durante el desarrollo embrionario y fetal está asociado a defectos en

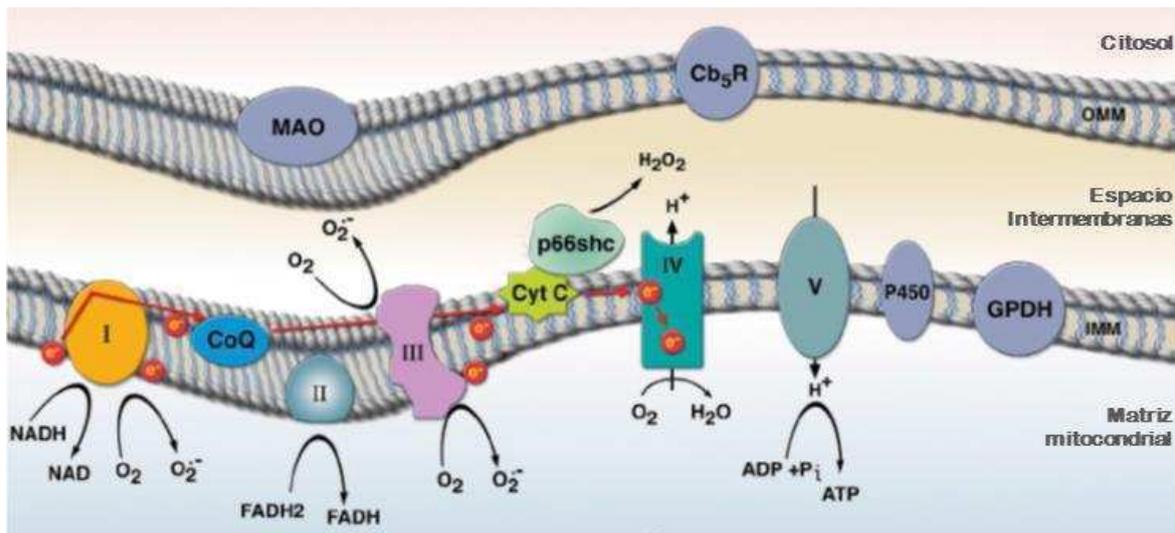
la implantación, malformaciones congénitas y aumento de morbilidad neonatal (Reece 1999, Wiznitzer *y col.* 1999).

Estudios de nuestro laboratorio mostraron en modelos experimentales de diabetes que la suplementación dietaria con ciertos ácidos grasos insaturados durante la gestación mejora parámetros vinculados a procesos pro-oxidantes, pro-inflamatorios y de homeostasis lipídica en el período de organogénesis temprana, en el desarrollo placentario, así como también previene la anómala programación intrauterina en el corazón de la descendencia (Capobianco *y col.* 2008a, Martínez *y col.* 2012, Capobianco *y col.* 2015).

Estrés oxidativo

Las reacciones de óxido-reducción ocurren en la naturaleza y los sistemas biológicos no son la excepción. Por el contrario, múltiples procesos celulares básicos incluyen reacciones químicas de este tipo.

El oxígeno, molécula indispensable para la vida aerobia, se presenta comúnmente en su forma más estable, la molécula diatómica O_2 . Durante la reducción del O_2 a agua en la cadena de transporte de electrones en la membrana interna mitocondrial, se incorporan cuatro electrones en distintas etapas. Un pequeño porcentaje de moléculas intermedias escapa de la cadena y por sus características se las denomina especies reactivas del oxígeno (ROS) (Finkel 2011) (ESQUEMA 7). Estas ROS pueden ser radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el hidroxilo (HO^{\cdot}) ambos altamente reactivos, y especies no radicalarias como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) involucrado directamente en la producción de radicales del oxígeno a través de las reacciones de Fenton o Haber-Waiss. Los radicales libres son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados en el orbital externo, dándole una configuración de alta inestabilidad. Esta entidad química, dadas sus características electrónicas es muy inestable, extraordinariamente reactiva y de vida media muy corta, que tiene una gran capacidad para combinarse inespecíficamente con una gran diversidad de biomoléculas celulares para ceder o tomar un electrón y de esta manera estabilizarse, generando a su vez nuevas formas radicalarias (Halliwell y Gutteridge 2007).



Esquema 7. Generación de ROS en la cadena respiratoria. Adaptado de (Finkel 2011)

Las ROS son productos del metabolismo celular y dependiendo de cuánto, cuándo y dónde se producen pueden ejercer roles fisiológicos o patológicos. Las ROS se producen principalmente en la mitocondria, así como también en peroxisomas, citosol y retículo endoplásmico. La generación de ROS no sólo está limitada a la cadena de transporte de electrones, sino también se producen en múltiples reacciones celulares de óxido-reducción tales como procesos de auto-oxidación de biomoléculas, metabolismo del ácido araquidónico o por acción de enzimas como la óxido nítrico sintasa (NOS), xantina oxidasa, NADPH oxidasa y citocromo P450 entre otras.

Los organismos aerobios evolutivamente desarrollaron sistemas de defensas contra las sustancias oxidantes que producen durante su metabolismo y por fuentes exógenas. Estas defensas le permiten neutralizar las especies reactivas de cualquier elemento (Halliwell y Gutteridge 2007).

Se denomina antioxidante a cualquier sustancia que retarda o previene la oxidación de un sustrato oxidable. El sistema de defensa antioxidante se encuentra formado por elementos enzimáticos y no enzimáticos que protegen a las células de manera conjunta. Los diferentes mecanismos de defensa pueden actuar de distintas forma: inhibiendo la formación de radicales libres, suprimiendo la iniciación de la cadena de oxidación o su propagación. A su vez el sistema

antioxidante incluye mecanismos de reparación o remoción de biomoléculas dañadas (Pisoschi y Pop 2015).

Los antioxidantes enzimáticos constituyen la primera defensa celular a la agresión por ROS y principalmente consiste en la acción de tres enzimas: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX). La SOD se encuentra en las células como una familia de metaloproteasas que eliminan el $O_2^{\cdot-}$. La CAT, localizada principalmente en los peroxisomas cataliza la reducción de H_2O_2 a H_2O . La GPX cataliza una variedad de peróxidos con ayuda de un sustrato, el glutatión reducido.

Dentro de los antioxidantes no enzimáticos cabe mencionar el ácido úrico, el glutatión, el ácido ascórbico (vitamina C), el α -tocoferol (vitamina E), los carotenoides y los compuestos fenólicos, que dadas sus características físico-químicas pueden interactuar con ROS, cada uno de manera particular, evitando la propagación de oxidación de biomoléculas celulares. Algunos de ellos son hidrosolubles mientras que otros son de naturaleza lipofílica, lo que va a direccionar su acción hacia distintos tipos de moléculas. Ciertos antioxidantes no enzimáticos no pueden ser sintetizados por el ser humano, como el ácido ascórbico, el α -tocoferol, los carotenoides entre otros, por lo cual es fundamental su incorporación con la dieta (Pisoschi y Pop 2015).

El mantenimiento del balance redox celular sólo es posible por medio de un equilibrio entre la generación de las especies reactivas y la capacidad del sistema de eliminarlas. En estado fisiológico la producción de ROS cumple múltiples funciones celulares. Las ROS participan como mediadores citotóxicos producidos por células fagocíticas del sistema inmune, intervienen en cascadas de señalización celular en diversos tipos celulares, en procesos de adhesión celular, tono vascular y apoptosis entre otros (Droge 2002, Valko *y col.* 2007).

Cuando la homeostasis de óxido-reducción (balance entre pro-oxidantes y antioxidantes) de un sistema biológico se encuentra alterada, se genera un estado denominado **estrés oxidativo**. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes (Sies y Cadenas 1985).

En situaciones de estrés oxidativo, las ROS son capaces de dañar de forma reversible o irreversible a todo tipo de biomoléculas. Los radicales libres pueden

reaccionar con otras moléculas generando nuevos radicales que pueden ser o no tan reactivos como las especies originales.

Los lípidos son moléculas blanco para el ataque de las ROS, causando la peroxidación lipídica a través la reacción de radicales libres con ácidos grasos insaturados, particularmente aquellos que forman parte de los fosfolípidos de membranas biológicas o mensajeros intracelulares. La peroxidación lipídica es un proceso autocatalítico que se da en etapas y conduce a la formación de compuestos de toxicidad diversa como malondialdehído, hidroxinoneal y hexanal. La peroxidación lipídica puede tener efectos nocivos sobre las funciones celulares, afectar la fluidez, permeabilidad y/o potenciales de membrana (Valko *y col.* 2007, Catala 2010).

La oxidación de proteínas conduce a una amplia gama de modificaciones químicas que incluyen la ruptura de cadenas polipeptídicas, el entrecruzamiento de cadenas, la modificación de restos aminoacídicos, la introducción de grupos reactivos en la proteína y dejar restos C- o N-terminales no usuales (Stadtman 2006). Estas modificaciones pueden tener como consecuencia cambios conformacionales, pérdida de actividad, cambios en la agregación y alterada inmunogénesis (Nguyen y Donaldson 2005, Lopez-Alarcon *y col.* 2014, Trnkova *y col.* 2015).

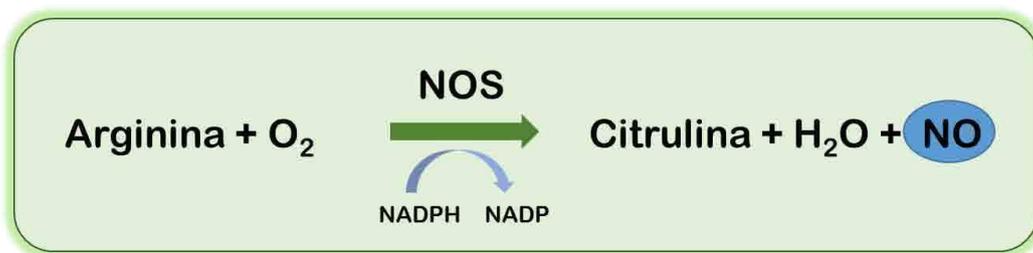
El ADN es otra biomolécula que es susceptible a oxidación por parte de las ROS. Los radicales libres, principalmente el radical hidroxilo, son capaces de dañar directamente las cadenas de ADN causando su fragmentación. A su vez los radicales libres pueden modificar las bases nitrogenadas, dando lugar a moléculas anómalas como la 8-hidroxi-desoxiguanosina, con capacidad mutagénica. Además las ROS son capaces de modificar la actividad de endonucleasas e incrementar la fragmentación enzimática del ADN (Halliwell y Aruoma 1991). El ADN mitocondrial (ADNm) es aún más susceptible al daño oxidativo por la cercanía de la cadena de transporte de electrones, fuente de producción de ROS. El exceso de producción de ROS genera daño a distintas biomoléculas en la mitocondria, incluidos el ADNm, que pueden llevar a disfunción mitocondrial (Costa *y col.* 2011).

*El desbalance entre especies pro-oxidantes y las defensas antioxidantes genera entonces un estado de **estrés oxidativo** que conduce a múltiples alteraciones estructurales y funcionales de biomoléculas y consecuente daño celular. Estos efectos deletéreos de las ROS han sido claramente identificados con las bases moleculares del envejecimiento y el desarrollo de diferentes enfermedades tales como cáncer, diabetes mellitus, patologías neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, etc (Valko y col. 2007).*

El Óxido Nítrico

El Óxido Nítrico (NO) es una pequeña molécula gaseosa que de acuerdo a sus características electroquímicas se categoriza como radical libre. Es de vida media muy corta y es rápidamente metabolizada.

Los mamíferos producen NO a partir del aminoácido L-arginina y O₂ por la acción de un grupo de enzimas conocidas como óxido nítrico sintasa (NOS), utilizando NADPH como cofactor (Esquema 8).



Esquema 8. Síntesis de óxido nítrico

Existen tres isoformas de la NOS: la neuronal (nNOS o tipo 1), la inducible (iNOS o tipo 2) y la endotelial (eNOS o tipo 3). La expresión de la nNOS y la eNOS son constitutivas, es decir que se encuentran en cantidades relativamente constantes en los tejidos y sus actividades dependen principalmente de las concentraciones intracelulares de Ca²⁺ libre.

La nNOS se localiza principalmente en las terminaciones nerviosas simpáticas y parasimpáticas, pero también se expresa en músculo vascular liso, cardíaco y esquelético (Sears y col. 2004). La eNOS se expresa fundamentalmente en células endoteliales, aunque también se expresa en cardiomiocitos, plaquetas y células mesangiales renales (Low y Bruckdorfer 2004, Sears y col. 2004). En el endotelio, el NO producido por la eNOS ejerce un rol clave en la homeostasis vascular: difunde al músculo liso subyacente y regula procesos de vasodilatación y ejerce acciones antitrombóticas.

A diferencia de las isoformas mencionadas anteriormente, la expresión de la iNOS, no depende de las concentraciones intracelulares de Ca²⁺, sino que es

activada por múltiples mediadores inflamatorios y genera grandes cantidades de NO, en diversos tipos celulares. Esta isoforma produce NO en concentraciones del orden nanomolar, mientras que las formas constitutivas lo hacen en el orden picomolar (Hollenberg y Cinel 2009). La activación de iNOS está implicada en funciones de defensa contra agentes patógenos y tumores y modula la respuesta inmune en distintos tipos celulares (Bogdan 2001).

Funciones biológicas del NO

Las funciones biológicas del NO son amplias y su acción dependerá de múltiples factores, entre ellos el tipo celular en el que se produce, las concentraciones y la localización subcelular de la enzima que lo genera.

Se ha caracterizado el comportamiento del NO como *dual* en cuanto a los efectos que ejerce a distintas concentraciones. A bajas concentraciones el NO reacciona directamente con ciertas moléculas blanco. Tal es el caso de la reacción del NO con el grupo hemo de diversas proteínas, formando el aducto nitrosil-hierro. Estas reacciones son muy rápidas y son las responsables de la mayoría de los efectos fisiológicos del NO. Estas situaciones comprenden la acción de las isoformas constitutivas de NOS que producen NO a bajas concentraciones y por períodos cortos de tiempo. Un ejemplo de acción directa del NO ampliamente estudiado es la activación de la guanilato ciclasa soluble, aumentando los niveles de GMP cíclico, que actúa como agente regulador del tono vascular, la presión sanguínea, la agregación plaquetaria y la neurotransmisión (Thomas *y col.* 2008, Hollenberg y Cinel 2009).

Los efectos indirectos se presentan cuando el NO se produce en grandes cantidades y en forma sostenida, generalmente por la iNOS. En estos casos el NO reacciona con oxígeno o el anión superóxido generando ***especies reactivas del nitrógeno*** que participan en procesos fisiopatológicos. Las RNS incluyen distintas moléculas con diverso grado de reactividad, incluyendo el peroxinitrito (ONOO⁻), un potente agente oxidante, capaz de dañar biomoléculas y ejercer efectos citotóxicos (Szabo 2003, Pacher *y col.* 2007). El ONOO⁻ modifica los residuos tirosina en las proteínas para formar nitrotirosinas. La nitración de las proteínas puede inactivar proteínas citosólicas y mitocondriales, causando daño celular y resultando en un estado de *estrés nitrativo* (Johansen *y col.* 2005).

Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la patología diabética

Son considerables las evidencias que muestran el importante papel que juegan estrés oxidativo y nitrativo en la patogénesis y complicaciones de la diabetes mellitus.

En la patología diabética, diferentes mecanismos pueden contribuir al estado de estrés oxidativo y sus efectos celulares, en estrecha relación con el control glucémico y los niveles de triglicéridos séricos (Collins y col. 1998, Evans y col. 1999).

Los órganos más afectados por las complicaciones de la patología diabética son aquellos que presentan células insulino-independientes para la captación de glucosa. Este es el caso de las células endoteliales de la retina, las células mesangiales de los glomérulos renales y neuronas y células de Schwann en nervios periféricos (Brownlee 2005).

Los mecanismos de daño que subyacen a la hiperglucemia son varios e incluyen el incremento del flujo de la glucosa y otros azúcares a la vía de los polioles, incremento en la formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs), incremento en la expresión de receptores para AGEs y sus ligandos, activación de la proteína quinasa C e incremento de la actividad de la vía de las hexosaminas. Todas estas vías son activadas por la superproducción de ROS en la mitocondria (Giacco y Brownlee 2010). Este aumento de ROS mitocondrial se debe principalmente al incremento de glucosa que se oxida en el ciclo de los ácidos tricarbónicos, dada su alta concentración intracelular. En consecuencia, se genera un aumento en la disponibilidad de donores de electrones de la cadena respiratoria NADH y FADH₂. Esto conduce a un aumento en el potencial de la membrana mitocondrial a niveles tales que la cadena de electrones se bloquea y de esta forma los electrones que son transferidos a la Coenzima Q luego son cedidos al O₂ generando grandes cantidades de O₂⁻ (Brownlee 2005). El estado de hiperglucemia además puede colapsar los sistemas de defensa antioxidantes (Boveris y col. 1985). En este estado de *estrés oxidativo*, se induce la disfunción mitocondrial y eventualmente la muerte celular por procesos apoptóticos (Ortega-Camarillo y col. 2006).

El estado hiperglucémico, a su vez es capaz de incrementar la expresión y/o actividad de la enzima iNOS, a través de la translocación del factor de transcripción NF- κ B que activa la expresión de diversos genes involucrados en procesos pro-inflamatorios, entre ellos la iNOS. La sobreproducción de NO junto con el aumento de $O_2^{\cdot-}$ conducen a la formación de ONOO $^{\cdot-}$, radical altamente reactivo capaz de dañar al ADN, inactivar defensas antioxidantes, iniciar lipoperoxidación y nitrar proteínas alterando su funcionalidad (Soriano *y col.* 2001, Turko *y col.* 2001, Szabo 2003).

El ONOO $^{\cdot-}$ juega un rol importante como mediador de los cambios patológicos asociados a la diabetes como la nefropatía y retinopatía diabética (Kowluru *y col.* 2007, Gao *y col.* 2013, Dellamea *y col.* 2014). En células epiteliales del cristalino, elevados niveles de glucosa conducen a la nitración del factor NF- κ B que activa la expresión de iNOS, estableciendo una retroalimentación positiva del estado oxidativo e inflamatorio (Li *y col.* 2013).

Además de los daños señalados por la formación de ONOO $^{\cdot-}$, la disminución de la biodisponibilidad de NO en el endotelio vascular impide la normal relajación muscular. A su vez el endotelio expresa en su membrana receptores para colesterol-LDL oxidado y AGEs. La unión de los diferentes ligandos a sus receptores inician cascadas de señalización que conducen a un aumento de $O_2^{\cdot-}$ por vías enzimáticas y producción de NO por la eNOS desacoplada, produciéndose más ONOO $^{\cdot-}$. De esta forma se activan vías inflamatorias de la célula endotelial, llevando a la producción de decenas de moléculas cuyo efecto biológico se verá evidenciado como *disfunción endotelial* (Szabo 2009, Storino *y col.* 2014).

Por su parte, la peroxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) constituye quizás la mayor contribución de los radicales libres a la génesis y agravamiento de la aterosclerosis. Estas son algunas de las alteraciones en el sistema vascular dadas por el estado de estrés oxidativo que se vinculan con el aumento del riesgo cardiovascular en pacientes diabéticos (Aronson y Rayfield 2002, Farhangkhoei *y col.* 2005).

Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la gestación y efecto de la diabetes materna.

La gestación es un estado fisiológico que se acompaña de una gran demanda energética, alta tasa metabólica y elevados requerimientos de oxígeno. Podría pensarse al embarazo entonces, como un estado pro-oxidante *per se*, evidenciando diversos marcadores de estrés oxidativo a lo largo de la gestación (Toescu y col. 2002, Palm y col. 2009). Este aumento de ROS está acompañado de cambios en los sistemas de defensa antioxidante (Gitto y col. 2002). Algunos trabajos evidencian un incremento de actividad antioxidante que conduce a un balance entre ROS y antioxidantes (Djordjevic y col. 2004).

La placenta es uno de los principales órganos que produce ROS en sus diversos tipos celulares a nivel de la cadena de transporte de electrones mitocondrial y por vías enzimáticas como la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, NOS, etc (Myatt y Cui 2004). Durante el desarrollo placentario las ROS cumplen diversas funciones fisiológicas. A comienzo de la gestación bajos niveles de O₂ son esenciales para inducir la normal proliferación y angiogénesis propia del desarrollo placentario. Hacia el final del primer trimestre cuando la circulación placentaria está completamente establecida, aumenta la presión de O₂, a su vez que aumentan las ROS, particularmente en el sincitiotrofoblasto y se modifican las defensas antioxidantes. Estos balances dinámicos entre ROS y antioxidantes están involucrados en la regulación de diferentes procesos como la proliferación, invasión y migración, fusión y apoptosis del trofoblasto, así como también la angiogénesis placentaria (Myatt y Cui 2004, Tuuli y col. 2011).

El NO es mediador clave en diversos procesos reproductivos entre ellos la decidualización y la implantación, regula el tono vascular y el remodelamiento arterial uterino (Thaler y Epel 2003). Se ha evidenciado expresión de eNOS e iNOS en diversos tipos celulares placentarios, tanto en humanos como en diversos modelos animales y sus expresiones varían a lo largo de la gestación, modulando la angiogénesis y vasculogénesis placentaria (Suzuki y col. 2009, Krause y col. 2011). El NO es capaz de regular la actividad de enzimas proteolíticas de remodelación de la matriz extracelular (metaloproteasas, MMPs), proceso clave durante el desarrollo feto-placentario (Vu y Werb 2000).

El NO participa en el crecimiento fetal de ratas y la inhibición de su síntesis conduce a la restricción del crecimiento fetal (Neerhof y col. 2011).

Durante la organogénesis el NO actúa como morfógeno evidenciando un patrón de expresión espacio-temporal. Anómalos niveles de NO o alteraciones en la expresión de las enzimas que lo sintetizan conducen a defectos en el desarrollo embrionario y fetal (Kulandavelu *y col.* 2013, Tiboni y Ponzano 2014).

Las tres isoformas de NOS se expresan en el sistema nervioso murino desde mediados de la gestación y la isoforma neuronal incrementa su expresión en el cerebro conforme avanza la gestación (Keilhoff *y col.* 1996, Ling *y col.* 2012). En diversos modelos animales, se observó que el NO regula la diferenciación y migración células de la cresta neural durante la morfogénesis craneofacial y participa en el desarrollo del tubo neural (Plachta *y col.* 2003, Kong *y col.* 2014).

En el corazón en desarrollo de ratas se observó la expresión de iNOS y eNOS en estadios tempranos, participando en la cardiomiogénesis (Bloch *y col.* 1999). La expresión anómala de la eNOS conduce a malformaciones en el desarrollo embrionario del corazón en modelos murinos, llevando a defectos en la formación de septos cardíacos y las válvulas aórticas, bicúspide y tricúspide (Lee *y col.* 2000, Feng *y col.* 2002, Liu *y col.* 2013).

En el pulmón fetal de ratas se ha encontrado la expresión de las tres isoformas de NOS, con incrementos evidentes hacia finales de la gestación (Xue *y col.* 1996, Zambuzzi *y col.* 2009). El NO está involucrado en el desarrollo de la vasculatura del pulmón fetal y a su vez facilita la vasodilatación pulmonar a término, evento necesario para la transición al medio aéreo en el nacimiento (Abman *y col.* 1999, Gao y Raj 2010). Además, el NO participa como morfógeno en la ramificación pulmonar (Young *y col.* 2002).

El **estado diabético** durante la gestación conduce a un estado pro-inflamatorio y pro-oxidante como consecuencia del exceso de sustratos oxidables en la circulación materna, que altera el desarrollo placentario, embrionario y fetal tanto en pacientes como en modelos animales de diabetes (Jawerbaum y Gonzalez 2006, Lappas *y col.* 2011, Zhao y Reece 2013).

En pacientes diabéticas gestantes se observaron marcadores de estrés oxidativo en plasma como aumento de lipoperóxidos e hidroperóxidos, disminuida capacidad antioxidante total y menores niveles de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (Toescu *y col.* 2004, Lopez-Tinoco *y col.* 2013).

Numerosos trabajos exponen los efectos adversos del estrés oxidativo y nitrativo en placentas tanto de mujeres como en modelos experimentales de diabetes (Myatt 2010, Lappas *y col.* 2011, Pereira y Martel 2014).

Trabajos previos de nuestro laboratorio evidenciaron elevada producción de NO en placentas de ratas diabéticas en diversos períodos de la gestación, así como también incremento del daño inducido por peroxinitritos y elevada peroxidación lipídica (Capobianco *y col.* 2005, Pustovrh *y col.* 2005a, Martinez *y col.* 2011a). En el mismo sentido, se observó incremento de lipoperóxidos, producción de NO e incremento de proteínas nitradas en placentas a término de pacientes diabéticas (Capobianco *y col.* 2012).

El NO es un importante regulador placentario y su anómalo metabolismo en la diabetes materna conduce a defectos en el desarrollo y función de la vasculatura feto-placentaria (San Martin y Sobrevia 2006, Leach *y col.* 2009).

Por su parte, la elevada producción de NO y peroxinitritos en la placenta diabética incrementa la actividad de las MMPs 2 y 9, eventos que se asocian a procesos fisiopatológicos (Pustovrh *y col.* 2005a, Capobianco E *y col.* 2012).

El embrión también se ve claramente afectado por la diabetes materna. La diabetes pregestacional con deficiente control metabólico, está asociada a defectos en el desarrollo del sistema nervioso central, malformaciones cardíacas y alteraciones de estructuras craneofaciales (Ornoy *y col.* 2015). Si bien se estima que son múltiples las causas que subyacen a la embriopatía diabética, se considera que tiene un rol clave el *estrés oxidativo* que se genera como consecuencia del aumento de las ROS y el desbalance de los sistemas de defensa antioxidantes en el embrión (Wang *y col.* 2015b).

Una delicada regulación espacio-temporal de los procesos apoptóticos es necesaria para la normal organogénesis. Diversos trabajos muestran el vínculo entre la embriopatía diabética y la activación de vías pro-apoptóticas, inducidas por el aumento del estrés oxidativo y nitrativo (Loeken 2005, Yang *y col.* 2008, Cao *y col.* 2012).

En modelos experimentales de diabetes se observó que la hiperglucemia es capaz de activar la expresión de iNOS en embriones de ratón (Yang *y col.* 2010). Trabajos previos de nuestro laboratorio evidenciaron que la producción de NO

está incrementada en embriones de rata en modelos de diabetes moderada y severa, eventos que se asocian al aumento de la tasa de malformaciones (Jawerbaum *y col.* 1998, Jawerbaum *y col.* 2001). A su vez, se encontraron elevados niveles de nitración proteica, indicador de daño inducido por peroxinitritos, en el tubo neural, pliegues neurales y en el corazón en desarrollo de embriones de ratas diabéticas (Jawerbaum *y col.* 2005). Consecuente con el aumento de NO y peroxinitritos, en embriones de ratas diabéticas se observó un aumento de la actividad de las MMPs, que se asocia a alteraciones en remodelamiento de la matriz extracelular, proceso fundamental en desarrollo embrionario (Higa *y col.* 2011).

El estado de estrés oxidativo característico de la gestación diabética, altera múltiples vías de señalización celular involucradas en el proceso de cardiomiogénesis en embriones de ratones, anomalías que pueden conducir a malformaciones congénitas del corazón (Morgan *y col.* 2008, Wang *y col.* 2015a, Wang *y col.* 2015c). Estudios de nuestro grupo de trabajo evidenciaron aumento de la actividad de NOS en el corazón fetal de rata diabética en el período de post-placentación (Pustovrh *y col.* 2007).

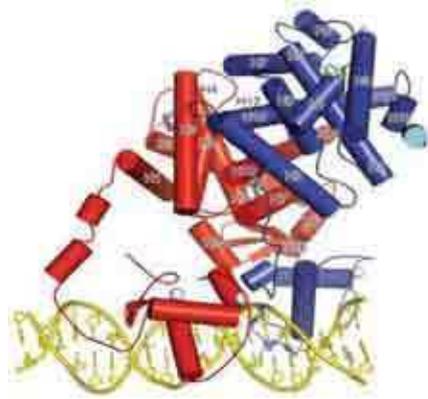
Receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR)

Estructura, mecanismo de acción y localización de los PPAR

Los *receptores activados por proliferadores peroxisomales* (PPAR) pertenecen a la super-familia de receptores nucleares. Son factores de transcripción activados por ligando que regulan la expresión de numerosos genes involucrados en procesos tales como la homeostasis metabólica, eventos reproductivos y de desarrollo, procesos anti-inflamatorios e inmunes, etc (Bensinger y Tontonoz 2008).

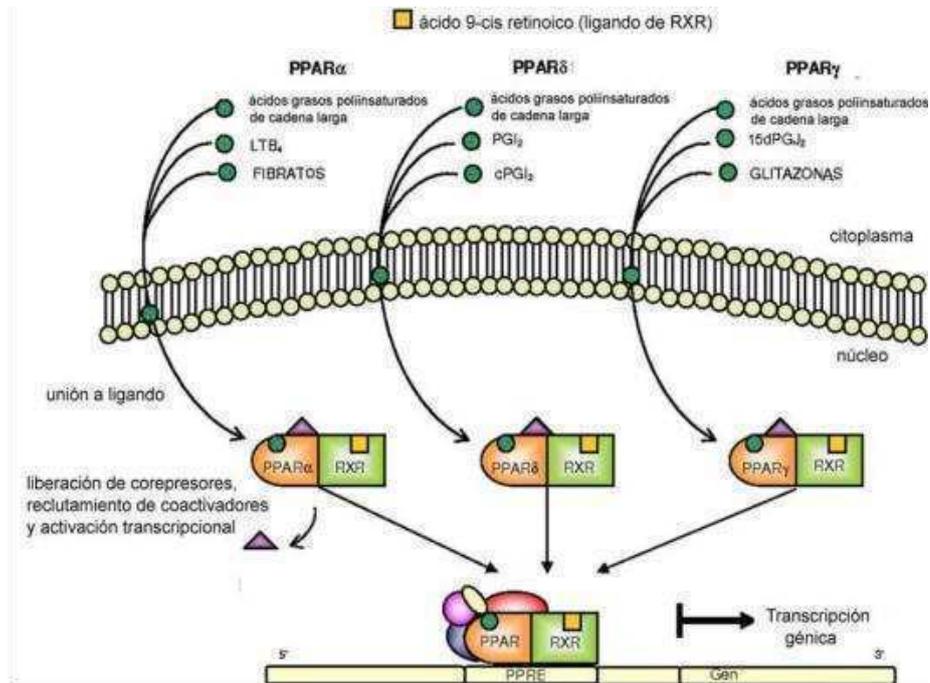
Se han identificado tres isotipos de PPAR codificados por distintos genes: PPAR α (NRC1C1), PPAR β/δ (NRC1C2) y PPAR γ (NRC1C3), presentando una homología de secuencias mayor al 80% entre la rata, el ratón y el humano, lo que evidencia un alto grado de conservación entre especies (Jawerbaum y Capobianco 2011).

En su estructura se pueden reconocer los dominios típicos de los receptores nucleares: posee un *dominio A/B* N-terminal que contiene la función de transactivación independiente de ligando (AF-1), el *dominio C* que se une a secuencias de respuesta a los PPAR en ADN (PPRE, elementos de respuesta a PPAR) a través su estructura “dedos de zinc”, el *dominio D* que corresponde a una región bisagra y el *dominio E* que posee la función de la activación dependiente de ligando AF-2, cuya estructura espacial forma una cavidad hidrofóbica la cual recibe al ligando. Además, el *dominio E* participa en la heterodimerización con el receptor del ácido 9 *cis*-retinoico (RXR) (Esquema 9).



Esquema 9. Vista de PPAR γ (rojo) formando heterodímero con el RXR- α (azul), con sus respectivos ligandos (verde), junto a coactivadores (celeste y lila), unidos al ADN. Adaptado de (Chandra y col. 2008).

En su mecanismo clásico de acción, los PPAR heterodimerizan con el receptor del ácido retinoico (RXR, NR2B), aún en ausencia de ligando. De esta forma suelen encontrarse en el citosol o en el núcleo unidos a los PPRE presentes en las regiones promotoras de sus genes blanco (Benz y col. 2012). Estas secuencias PPRE son variantes de repeticiones directas de elementos de respuesta a hormonas (AGGTCA) separadas por una sola base que se encuentran en la región promotora de numerosos genes (Palmer y col. 1995). La unión del ligando inicia cambios conformacionales en el receptor, que resultan en la liberación de co-represores como N-COR, SMRT o Rip140 y el reclutamiento de co-activadores como SRC1, TIF2, p300/CBP o PGC-1 y la subsiguiente activación de la expresión del gen blanco (Feige y Auwerx 2007, Viswakarma y col. 2010)(Esquema 10).



Esquema 10. Representación esquemática de la vía clásica de activación de los PPAR, mediante la unión de ligandos específicos de cada PPAR, endógenos o sintéticos, o ácidos grasos poliinsaturados agonistas de los tres isotipos. Adaptado de (Jawerbaum y Capobianco 2011).

Además del mecanismo clásico de activación, se han descrito diversos mecanismos de acción de los PPAR que no involucran su unión al ADN, sino que median efectos represivos a través de inhibir la acción de otros factores de transcripción claves. Este mecanismo denominado *transrepresión* puede deberse a que los PPAR inhiben la unión de otros factores de transcripción al ADN a través de interacciones proteína-proteína, o pueden secuestrar cofactores necesarios para su actividad. De esta forma, por ejemplo PPAR α puede reprimir la expresión génica mediada por NF- κ B, secuestrando la subunidad p65 de dicho factor de transcripción. PPAR β/δ en ausencia de ligando puede unirse a BCL-6 y tras la unión al ligando liberar a este represor e inhibir la transcripción de sus genes blanco (Tan y col. 2005, Feige y col. 2006).

Las acciones de los PPAR están reguladas por los niveles de expresión, síntesis y grado de estabilidad del receptor, las modificaciones post-traduccionales que sufren, la disponibilidad de sus ligandos con distinta afinidad y

especificidad, así como también el reclutamiento de cofactores (DiRenzo *y col.* 1997, Desvergne *y col.* 2006).

Las modificaciones post-traduccionales que modulan la función de los PPAR son varias e incluyen la fosforilación por acción de quinasas como las MAPK, PKA y PKC en diversos residuos de los receptores PPAR que pueden conducir a cambios conformacionales y modificar la afinidad por los ligandos, RXR, cofactores y genes blanco (Diradourian *y col.* 2005). Al igual que otros receptores nucleares, los niveles de PPAR pueden ser regulados por la ubiquitinación y degradación vía proteosoma, mecanismo modulado por distintos factores que incluyen la unión a ligandos, corepresores y cofactores (Hauser *y col.* 2000, Blanquart *y col.* 2002). Otro sistema de regulación post-traducciona es la sumoilación, es decir la adición de pequeñas moléculas homólogas a la ubiquitina, cambio que puede modificar la actividad transcripcional del receptor o los mecanismos de transrepresión (Ohshima *y col.* 2004, Pascual *y col.* 2005).

Los PPAR presentan múltiples ligandos endógenos y sintéticos que regulan la expresión de los genes blanco. Cada PPAR posee ligandos isotipo-específicos y a su vez existen ligandos, mayormente ácidos grasos mono y poliinsaturados, que son compartidos por los tres PPAR (Grygiel-Gorniak 2014). Los estudios cristalográficos de los PPAR muestran que el sitio de unión al ligando forma un “bolsillo hidrofóbico” que puede acomodar a un gran número de moléculas lipídicas, hecho que explica la capacidad de estos receptores de unirse a diversos ligandos con distinta afinidad y desencadenar múltiples respuestas (Xu *y col.* 2001, Chandra *y col.* 2008) (Esquema 10)

El presente trabajo de tesis se va a centrar en las funciones de las isoformas PPAR α y PPAR γ .

PPAR α se expresa principalmente en tejidos con alta tasa metabólica como el hígado, corazón, músculo esquelético, glándula adrenal y placenta (Braissant *y col.* 1996, Auboeuf *y col.* 1997). PPAR α también se expresa en células del sistema inmune como linfocitos, macrófagos y células dendríticas.

PPAR α puede ser activado por ciertos ácidos grasos de cadena larga como ácido araquidónico (AA), ácido linoleico, ácidos α y γ -linolénico, ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA) (Forman *y col.* 1997).

Por su parte, PPAR α es activado por diversos eicosanoides como el Leucotrieno B₄ (LTB₄) (Forman *y col.* 1997, Hihi *y col.* 2002). Este último es un potente mediador lipídico sintetizado a partir de ácido araquidónico (AA) liberado de las membranas biológicas por acción de fosfolipasas, y luego es metabolizado por las enzimas 5-lipooxigenasa (5-LOX) y la LTA₄ hidrolasa para formar el LTB₄. El LTB₄ puede unirse además, a sus receptores de membrana denominados BLT1 y BLT2 y actuar a través de mecanismos clásicos de receptor acoplado a proteína G (Okuno *y col.* 2005). Se ha demostrado el efecto fisiológico del LTB₄ como ligando endógeno de PPAR α que media procesos anti-inflamatorios, evidenciando efectos distintos en la respuesta de este mediador lipídico de acuerdo al receptor al que se una (Narala *y col.* 2010).

Los fibratos (clofibrato, fenofibrato, ciprofibrato, bezafibrato, gemfibrozil) y Wy14643 son ligandos farmacológicos de PPAR α (Forman *y col.* 1997). Algunos de estos compuestos son utilizados para el tratamiento de las dislipidemias dada su capacidad de regular el metabolismo lipídico, disminuir las complicaciones aterogénicas y el riesgo cardiovascular asociado al síndrome metabólico (Desvergne *y col.* 2004, Fievet y Staels 2009). En los últimos años se han desarrollado nuevos agonistas farmacológicos con efecto parcial o dual (agonistas de PPAR α/δ o α/γ), muchos de ellos se encuentran aún en etapas pre-clínicas (Mansour 2014).

PPAR α controla la homeostasis lipídica en diferentes órganos, fundamentalmente en hígado, músculo esquelético y corazón, así como también participa en el metabolismo de los carbohidratos (Lefebvre *y col.* 2006). Estudios en ratones nulos o deficientes en el gen de PPAR α mostraron su rol clave en la β oxidación lipídica mitocondrial y peroxisomal, transporte e incorporación de ácidos grasos y el catabolismo de los triglicéridos entre otros, particularmente durante la adaptación al estado de ayuno (Aoyama *y col.* 1998, Leone *y col.* 1999, Muoio *y col.* 2002). En órganos como el hígado y el corazón, PPAR α regula la expresión de proteínas implicadas en múltiples aspectos del metabolismo de lípidos (Mandard *y col.* 2004). PPAR α activa genes que codifican para proteínas

transportadoras de ácidos grasos como la translocasa de ácidos grasos (FAT), la proteína transportadora de ácidos grasos (FATP1) y las proteínas de unión a ácidos grasos (FABP) (Motojima *y col.* 1998, Bonen *y col.* 2004). Al atravesar la membrana plasmática los ácidos grasos son esterificados a ésteres de acil-CoA evitando su eflujo desde el interior de la célula. Esta reacción está mediada por la enzima acil-CoA sintetasa, cuya expresión también está regulada por PPAR α (Schoonjans *y col.* 1996). A su vez, la activación de este receptor nuclear regula expresión de la carnitina palmitoil-transferasa 1 (CPT1), enzima limitante del proceso de β oxidación lipídica, que permite el ingreso de los ácidos grasos a la mitocondria (Mascaro *y col.* 1998). En la matriz mitocondrial, los ácidos grasos entran en la vía de la β oxidación y la mayoría de las enzimas involucradas en este proceso también están reguladas transcripcionalmente por PPAR α : acil-CoA deshidrogenasas (de cadena muy larga, larga, media y corta), enoil-CoA hidratasa, 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa y 3-cetoacil-CoA tiolasa.

Los ácidos grasos de cadena de más de 20-22 carbonos, otros derivados lipídicos como eicosanoides y los ácidos grasos ramificados son oxidados parcialmente en los peroxisomas, generando sustratos que luego entrarán en la mitocondria para su oxidación total. La expresión de enzimas claves en la oxidación peroxisomal como la acil-CoA oxidasa (ACO), también están bajo la regulación transcripcional de PPAR α (Varanasi *y col.* 1996).

PPAR α está involucrado también en el metabolismo de los triglicéridos y las lipoproteínas. PPAR α regula la expresión de apoproteínas: disminuye la expresión de apo C-III presente en las VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) e incrementa la expresión de las apoproteínas apoA-I y apoA-II presentes en las HDL (lipoproteínas de alta densidad). A su vez estimula la expresión de la lipoprotein lipasa (LPL) con función triglicérido hidrolasa en hígado y músculo favoreciendo la hidrólisis de VLDL y conversión a LDL. En este sentido, agonistas de PPAR α como los fibratos, ejercen sus efectos benéficos, en parte, debido a su capacidad de reducir la producción de VLDL y estimular el catabolismo de las partículas ricas en triglicéridos, lo cual indirectamente disminuye las LDL, estimulando la formación HDL (Fruchart *y col.* 2003). La interacción de las HDL con el receptor SR-BI (receptor *scavenger* BI) o transportadores de la familia ABC (ATP binding cassette) A1, G1 o G4, estimula el eflujo del colesterol de los tejidos periféricos conduciendo

al transporte reverso de colesterol (TRC) y finalmente a su excreción hepática. Agonistas de PPAR α incrementan también la expresión de ABCA1 y SR-BI (Chinetti *y col.* 2001).

A su vez, PPAR α participa en la regulación de eventos anti-inflamatorios. Ratones nulos para el gen de PPAR α , muestran respuesta inflamatoria exacerbada ante el tratamiento con lipopolisacáridos y en modelos de asma experimental y de enfermedades autoinmunes (Straus y Glass 2007, Yoo *y col.* 2011, Hecker *y col.* 2015). PPAR α se expresa en células del sistema inmune, ejerciendo múltiples funciones, entre ellas modulando la expresión de citoquinas hacia un perfil anti-inflamatorio (Cunard *y col.* 2002, Jones *y col.* 2002).

Se han descrito varios mecanismos por los cuales PPAR α regula vías de señalización en condiciones inflamatorias crónicas y agudas (Cuzzocrea *y col.* 2006, Gervois y Mansouri 2012). Por ejemplo, la activación de PPAR α conduce a su interacción con factores de transcripción del complejo NF- κ B reprimiendo la transcripción de genes inducidos por señales inflamatorias, tales como moléculas de adhesión, metaloproteasas e interleuquinas pro-inflamatorias (Delerive *y col.* 1999, De Bosscher *y col.* 2006). Por otro lado PPAR α es capaz de regular vías inflamatorias en forma sinérgica a través de la interacción con la vía de señalización de los glucocorticoides y de los estrógenos ejerciendo una acción represiva de la vía NF- κ B (Bougarne *y col.* 2009, Crisafulli *y col.* 2009). A su vez actúa por la vía clásica estimulando la transcripción de citoquinas anti-inflamatorias y el factor i- κ B (Delerive *y col.* 2000).

PPAR α también modula la producción de NO, un importante mediador inflamatorio, capaz de desencadenar respuestas citotóxicas a concentraciones elevadas. En modelos murinos se han descrito elementos de respuesta a PPAR en la región promotora del gen iNOS (Crosby *y col.* 2005). Diversos estudios mostraron el papel del receptor PPAR α como regulador negativo de la expresión de iNOS y la producción de NO, así como también la capacidad de agonistas de PPAR α para regular la sobreproducción de este mediador inflamatorio en diversas condiciones fisiopatológicas (Crisafulli y Cuzzocrea 2009, Clockaerts *y col.* 2011, Gray *y col.* 2011). También, agonistas de PPAR α contribuyen a este efecto de regulación negativa, incrementando la degradación de la enzima iNOS por la vía proteosomal (Paukkeri *y col.* 2007).

PPAR α además, está involucrado en el balance oxidativo celular. Estudios en ratones nulos para el gen de PPAR α , mostraron su importancia en la homeostasis redox dado que en este modelo se encontró menor actividad de sistemas antioxidantes, mayor producción de especies oxidantes, proteínas nitradas y lipoperóxidos, particularmente en estado de ayuno (Abdelmegeed *y col.* 2009). Por otra parte, diversos estudios mostraron que la activación de este receptor resulta en la inducción de la expresión de enzimas antioxidantes como la CAT, la SOD y mediadores de la vía del glutatión (Devchand *y col.* 1996, Inoue *y col.* 1998). También, hay evidencia que sugiere que PPAR α es capaz de regular los niveles plasmáticos de lipoperóxidos y que la administración de bezafibrato, agonista de PPAR α , reduce su producción (Inoue *y col.* 1997, Inoue *y col.* 1998).

PPAR γ se expresa principalmente en tejido adiposo marrón y blanco y en menor medida en células del sistema inmune, intestino, colon, sistema cardiovascular, pulmón, placenta, etc (Braissant *y col.* 1996, Auboeuf *y col.* 1997, Barak *y col.* 1999). Se han descrito tres ARNm de este receptor producto de splicing alternativo: PPAR γ 1, PPAR γ 2 y PPAR γ 3. El ARNm PPAR γ 1 y PPAR γ 3 dan como resultado la misma proteína, mientras que PPAR γ 2 contiene 30 aminoácidos más en la región N-terminal (Tontonoz *y col.* 1994). PPAR γ 1 se expresa en varios tejidos y PPAR γ 2 lo hace principalmente en tejido adiposo en condiciones fisiológicas (Werman *y col.* 1997, Rosen *y col.* 2002).

PPAR γ es activado por la prostaglandina 15dPGJ₂, metabolito derivado de la PGD₂, que se une directamente al dominio de unión al ligando (Forman *y col.* 1995). Como se mencionó anteriormente, ciertos ácidos grasos insaturados como el DHA y el EPA, son capaces de activar a los PPAR, incluyendo a PPAR γ . Dentro de los ligandos farmacológicos se pueden nombrar a diversas drogas como las tiazolidinedionas, pioglitazona y rosiglitazona entre otras, que se han utilizado para el tratamiento de la DM2 y la isulinorresistencia (Sauer 2015).

PPAR γ es considerado uno de los factores claves en el proceso de adipogénesis y su expresión está activada durante estos eventos de diferenciación por diversas vías que incluyen regulación transcripcional y epigenética (Lee y Ge 2014). Diversos estudios muestran también la participación de este receptor en la diferenciación de otros tipos celulares como miocitos, células cardíacas,

macrófagos alveolares, etc (Singh *y col.* 2007, Schneider *y col.* 2014, Zadegan *y col.* 2015).

Como se mencionó anteriormente, la activación de PPAR γ promueve la diferenciación y la activación de genes en adipocitos, particularmente aquellos genes relacionados con la lipogénesis, incorporación y acumulación de triglicéridos (Rosen y MacDougald 2006).

A su vez PPAR γ es un importante modulador del metabolismo de la glucosa y los lípidos desempeñando papeles claves en la sensibilidad a la insulina en tejidos periféricos. La regulación del número de adipocitos y la actividad lipogénica por este receptor permite el correcto almacenamiento del exceso de lípidos dietarios en tejido adiposo. La acumulación inapropiada de lípidos en hígado o músculo están estrechamente relacionados con la patogénesis de la insulinoresistencia y el desbalance del metabolismo de la glucosa (Sinha *y col.* 2002). La activación de genes blanco por parte de PPAR γ conduce al adecuado almacenamiento en tejido graso, evitando su acumulación en otros tejidos y sus efectos deletéreos. En estas bases puede sustentarse el efecto de drogas antidiabéticas como las tiazolidinedionas que se unen directamente al receptor PPAR γ y aumentan la sensibilidad a la insulina y son capaces de re-direccionar la acumulación de lípidos del hígado y músculo hacia tejido adiposo y disminuir los niveles de ácidos grasos circulantes (Boden *y col.* 2005). Otro mecanismo que podría estar involucrado en la sensibilización a la insulina en tejidos periféricos, podría estar relacionado con la activación del receptor PPAR γ en tejido adiposo y su capacidad de regular la producción de hormonas denominadas adipocinas, como la adiponectina que es capaz de aumentar la sensibilidad a la insulina en diversos tejidos (Maeda *y col.* 2001, Berg *y col.* 2002).

Por otro lado, PPAR γ participa también en la homeostasis del colesterol activando la transcripción del receptor SR-BI y CD36 en macrófagos (Tontonoz *y col.* 1998, Chinetti *y col.* 2000). Similar a lo observado con PPAR α , agonistas de PPAR γ incrementan la expresión de ABCA1 en macrófagos e induciendo el eflujo de colesterol y controlando así los pasos iniciales del transporte reverso del colesterol (Chinetti *y col.* 2001).

Aún en forma más marcada que las otras isoformas de PPAR, PPAR γ media efectos anti-inflamatorios en diversos tipos celulares. Ligandos de PPAR γ

mostraron su capacidad de inhibir la producción de mediadores inflamatorios y citoquinas en macrófagos como TNF α , IL-1 β , IL-6 y MMP-9 (Jiang y col. 1998, Ricote y col. 1998). A su vez ligandos de este receptor mostraron efectos anti-inflamatorios en diversos modelos de enfermedades como aterosclerosis, insulinoresistencia inducida por obesidad, artritis, etc (Yamasaki y col. 2002, Corzo y Griffin 2013). Pacientes obesos y con DM2 tratados con glitazonas, mostraron una disminución de marcadores inflamatorios plasmáticos como TNF α , MMP-9, proteína C reactiva y moléculas de adhesión, así como también menores niveles del factor NF- κ B, incremento de I κ B, y disminución de ROS en células mononucleares circulantes (Aljada y col. 2001, Haffner y col. 2002). PPAR γ interactúa con factores de las vías NF- κ B, AP-1 y STAT-1 y a través de mecanismos de transrepresión regula negativamente la expresión de múltiples genes pro-inflamatorios (Delerive y col. 2001). Glass y colaboradores han aportado relevante evidencia de los mecanismos moleculares que subyacen a la acción de transrepression de PPAR γ en macrófagos y linfocitos y su implicancia en la mediación de eventos inflamatorios (Ricote y Glass 2007, Glass y Saijo 2010). En este sentido han descrito la capacidad de PPAR γ de regular negativamente la expresión de iNOS en macrófagos ante estímulos inflamatorios como LPS e interferón γ .

PPAR α y PPAR γ en el desarrollo fetal y placentario

Numerosos estudios han evidenciado la importancia de los receptores PPAR en diversos eventos reproductivos, desde etapas pre-concepcionales hasta el parto y la lactancia (Rees y col. 2008).

En el desarrollo y función placentaria:

Los PPAR juegan importantes roles en la regulación de la implantación del embrión y el desarrollo de la placenta (Fournier y col. 2007). Las tres isoformas de PPAR se expresan en la placenta, y a diferencia de PPAR δ que se expresa en este órgano en forma temprana, PPAR α y PPAR γ lo hacen más tardíamente (Barak y col. 2008). El desarrollo de ratones nulos para estos receptores ha permitido dilucidar distintos aspectos sobre su funcionalidad.

PPAR α se expresa en distintos tipos celulares placentarios y ratones nulos para el gen de PPAR α evidenciaron desarrollo placentario sin alteraciones

mayores, aunque sí poseen mayores tasas de abortos y mortalidad neonatal (Wang *y col.* 2002, Yessoufou *y col.* 2006). Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron en el período de placentación temprana en rata (día 14) que la activación de PPAR α con distintos agonistas disminuye la síntesis *de novo* de lípidos y la acumulación de diferentes especies lipídicas, al mismo tiempo que se evidenciaron efectos lipolíticos (Martinez *y col.* 2008). En placentas de rata a término, la activación de PPAR α fue capaz de reducir la producción de NO, a la vez que aumentó la expresión del propio receptor PPAR α (Martinez *y col.* 2011a). Estos resultados podrían estar indicando la importancia del receptor PPAR α en funciones vinculadas con el intercambio materno-fetal de nutrientes. Por otro lado, se ha reportado que agonistas farmacológicos de PPAR α son capaces de regular la secreción de hormonas placentarias esenciales para el mantenimiento de la gestación, en trofoblastos humanos. (Hashimoto *y col.* 2004).

PPAR γ es esencial para el normal desarrollo de la placenta. Ratones nulos para el gen de PPAR γ presentan muerte embrionaria a estadios tempranos (día 10.5) como resultado de anomalías en la proliferación, invasión y diferenciación de tejido placentario. Se han descrito en estos modelos alteraciones en la vasculatura placentaria así como también disminución de depósitos lipídicos (Barak *y col.* 1999).

Ligandos de PPAR γ modifican la morfología placentaria y regulan la expresión de múltiples proteínas involucradas en el transporte de ácidos grasos, modulando la incorporación y la acumulación de lípidos (Schaiff *y col.* 2007). En este mismo sentido, trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que PPAR γ participa de la homeostasis lipídica, regulando procesos de síntesis y utilización de lípidos en placenta de rata, así como también los niveles de su propio ligando endógeno, 15dPGJ₂ (Capobianco *y col.* 2005, Capobianco *y col.* 2008b).

Cabe destacar además, la capacidad de agonistas endógenos y farmacológicos de PPAR γ de disminuir la respuesta inflamatoria inducida por LPS en cultivo celular y tisular placentario humano, disminuyendo la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, la enzima COX-2 y MMPs a través de la represión de la vía NF- κ B (Lappas *y col.* 2002, Lappas *y col.* 2006).

En el período fetal:

En feto en desarrollo se expresan los tres isotipos de PPAR. A diferencia de PPAR δ que se expresa en el embrión desde estadios tempranos, PPAR α y PPAR γ comienzan a expresarse en el feto en el período de post-placentación (día 13.5 de gestación en rata). La distribución tisular de los distintos isotipos de PPAR en fetos de rata es similar a la encontrada en tejidos adultos (Braissant y Wahli 1998). Un patrón de expresión similar de los PPAR se ha descrito en tejidos fetales humanos (Abbott *y col.* 2010)

PPAR α se expresa principalmente en hígado, corazón, músculo esquelético, páncreas, sistema nervioso central, pulmón, etc (Abbott 2009). Se ha propuesto la participación de este receptor como regulador de crecimiento y diferenciación durante el desarrollo fetal principalmente en hígado (Gruppuso *y col.* 2000). Varios estudios en diversos modelos animales evidenciaron que la administración materna de activadores de PPAR α , incrementan la expresión de genes blanco de este receptor en hígado fetal en la gestación a término, como ACO, Citocromo P4A1 (Cyp4a10), CPT I, MCAD y LCAD (Ringseis *y col.* 2007, Palkar *y col.* 2010, Lin *y col.* 2015). Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que la activación fetal de PPAR α regula la acumulación de lípidos y la lipoperoxidación en dicho órgano fetal (Martinez *y col.* 2011b).

En el período fetal el corazón utiliza principalmente glucosa y lactato como sustratos oxidables y en el nacimiento se produce un cambio hacia la utilización de ácidos grasos como principal fuente de energía cardíaca, evento necesario para metabolizar la leche materna y adaptarse a nuevas condiciones fisiológicas (Finck 2007). Se ha descrito la participación de PPAR α en la regulación energética y el cambio de utilización de sustratos metabólicos del corazón en la transición a la vida extrauterina (Steinmetz *y col.* 2005, Buroker *y col.* 2008).

PPAR γ se expresa en el feto primero en el sistema nervioso central (día 13.5 al 15.5 en rata) y a partir del día 18.5 lo hace principalmente en el tejido adiposo marrón a niveles elevados respecto de otros tejidos (Braissant y Wahli 1998).

Como se mencionó anteriormente ratones nulos PPAR γ -/-, presentan muerte embrionaria al día 10.5 de gestación. Estos embriones además presentan alteraciones cardíacas como hipoplasia ventricular severa y degeneración de la

zona trabecular entre otras, siendo dichos defectos cardíacos consecuencia de la insuficiencia placentaria que presentan estos ratones (Barak *y col.* 1999).

La deficiencia de PPAR γ , estudiada en fetos de ratones PPAR γ +/- y quimeras para dicho gen, evidencian alteraciones en el desarrollo del tejido adiposo, anormales depósitos lipídicos en el hígado (hígado graso), y severas hemorragias intestinales. Además presentan muerte prematura por la falta de tejido adiposo (Barak *y col.* 1999).

Se ha descrito la importancia de PPAR γ en la diferenciación y maduración del pulmón (Simon *y col.* 2006, Rehan y Torday 2012). PPAR γ participa en la diferenciación de lipofibroblastos, células que captan y acumulan lípidos para proveer a las células alveolares de tipo II, las cuales producen el surfactante pulmonar (Rehan y Torday 2012). Trabajos de Chen y colaboradores mostraron que la expresión de PPAR γ se incrementa previo al nacimiento en lipofibroblastos en el pulmón y que los cambios en la expresión de este receptor van acompañados de cambios en la expresión de genes blanco con funciones adipogénicas, lo que podría indicar cambios en pos de incrementar la acumulación de triglicéridos para soportar la síntesis de surfactante de vital importancia para la transición a la vida extrauterina (Chen *y col.* 1998). PPAR γ también participa en la maduración pulmonar en la vida neonatal y la administración de agonistas farmacológicos y endógenos de este receptor estimulan la maduración del pulmón en el período alveolar (Wang *y col.* 2009).

Los PPAR en la gestación diabética

Los PPAR regulan vías metabólicas afectadas por la diabetes y agonistas de estos receptores presentan efectos anti-diabetogénicos, anti-inflamatorios y anti-oxidantes, benéficos para el tratamiento de la diabetes (Berger y Moller 2002). Como se ha mencionado anteriormente, los PPAR participan en múltiples procesos reproductivos, que incluyen el normal desarrollo y función placentaria y el desarrollo embrionario y fetal. Alteraciones en las vías de señalización de los PPAR pueden contribuir a la patogénesis de la diabetes en la gestación.

En pacientes diabéticas, los niveles de PPAR se encuentran alterados en la placenta (Arck *y col.* 2010, Jawerbaum y Capobianco 2011). PPAR α y PPAR γ se

encuentran reducidos en placentas de mujeres con diabetes y la activación de dichos receptores *in vitro* con agonistas endógenos y farmacológicos regula el alterado metabolismo lipídico y los elevados niveles de NO y lipoperóxidos (Jawerbaum *y col.* 2004, Capobianco *y col.* 2013).

En modelos experimentales de diabetes, numerosos trabajos de nuestro laboratorio estudiaron la expresión y función de los receptores PPAR, en la placenta, el embrión y el feto, en distintos momentos de la gestación.

Tanto en la placenta de rata diabética en el período de post-placentación como en la placenta a término se encontraron alteraciones en la expresión de PPAR α y PPAR γ y/o niveles de sus respectivos ligandos endógenos LTB₄ y 15dPGJ₂, efectos que pueden vincularse con anomalías inducidas por la diabetes materna tales como desbalance del metabolismo de los lípidos, estado pro-inflamatorio y pro-oxidante. A su vez estos trabajos muestran la capacidad de agonistas de PPAR de regular dichas anomalías *in vitro* e *in vivo* (Capobianco *y col.* 2005, Martínez *y col.* 2008, Pustovrh *y col.* 2009, Martínez *y col.* 2011a).

En la gestación diabética existe una mayor incidencia de malformaciones congénitas desarrolladas en el período de organogénesis temprana, que se evidencia en mayores índices de defectos en el tubo neural y del desarrollo cardíaco (Eriksson *y col.* 2003).

Diversos estudios muestran la asociación entre la deficiencia de ácido araquidónico, precursor de prostaglandinas (PG), con las malformaciones embrionarias inducidas por la diabetes materna (Jawerbaum y Gonzalez 2005). En este sentido, estudios en modelos animales de diabetes evidenciaron que en el período de organogénesis temprana los embriones poseen reducidos niveles de 15dPGJ₂, prostaglandina que posee funciones vinculadas al metabolismo lipídico y la homeostasis nitridérgica. Estos reducidos niveles de 15dPGJ₂ están asociados a una alterada producción de NO y aumento de nitración proteica, principalmente en pliegues neurales, tubo neural y el corazón en desarrollo (Jawerbaum *y col.* 2002, Jawerbaum *y col.* 2005).

En el período fetal se evidencia incremento de la transferencia de sustratos metabólicos de la madre diabética al feto que conduce al aumento de estrés oxidativo y desbalances metabólicos fetales (Jawerbaum y Gonzalez 2006, Herrera y Ortega-Senovilla 2010). En este contexto cobran relevancia las funciones anti-

inflamatorias y reguladoras del metabolismo lipídico de los PPAR (Jawerbaum y Capobianco 2011).

Hacia mediados de la gestación, fetos de ratas diabéticas presentan menores niveles de $15dPGJ_2$, mientras que la expresión del receptor $PPAR\gamma$ se encuentra incrementada, posiblemente debido a efectos compensatorios. $15dPGJ_2$, además, participa en la regulación de la actividad de metaloproteasas, importantes enzimas de remodelación tisular, evento clave en procesos del desarrollo, que a su vez son reguladas por mediadores pro-inflamatorios como el NO (Pustovrh y col. 2007, Pustovrh y col. 2009).

Por otra parte, se evidenció la capacidad del receptor $PPAR\alpha$ de regular el metabolismo lipídico de fetos de ratas diabéticas.

Hacia mediados de la gestación, si bien los niveles de $PPAR\alpha$ no se encuentran alterados en fetos de rata diabética, se encuentran reducidos los niveles de su ligando endógeno LTB_4 . Además los fetos de ratas diabéticas presentan mayor acumulación de lípidos, debido en parte al aumento de la síntesis *de novo*. Tanto el agonista endógeno LTB_4 , como el farmacológico clofibrato fueron capaces de regular dichas alteraciones. Esto evidencia la importancia de la vía de señalización de $PPAR\alpha$ en la homeostasis lipídica fetal, que se encuentra alterada en fetos de ratas diabéticas a mediados de la gestación (Martinez y col. 2008).

Caben destacar los trabajos realizados en nuestro laboratorio en los que se evidencian los efectos benéficos de ciertos ácidos grasos agonistas de PPAR, administrados en la dieta a ratas durante la gestación sobre alteraciones inducidas por la diabetes materna. Dietas suplementadas con aceite de oliva o aceite de cártamo, ricos en ácido oleico (n-9) y ácido linoleico (n-6) respectivamente regularon diversos parámetros relacionados con el desbalance lipídico fetal de ratas diabéticas, así como también redujeron marcadores pro-inflamatorios (Capobianco y col. 2008b, Higa y col. 2010).

En la gestación a término la activación tanto *in vitro* como *in vivo* de $PPAR\alpha$ regula el metabolismo lipídico en hígados de fetales de ratas diabéticas, disminuyendo la sobreacumulación de lípidos y el exceso de lipoperóxidos encontrados en este órgano fetal, previniendo la hepatomegalia y la macrosomía fetal inducidas por la diabetes materna (Martinez y col. 2011b).

Se ha demostrado que PPAR α y PPAR γ poseen funciones de relevancia durante el desarrollo feto-placentario y que las vías de señalización de ambos receptores se encuentran alteradas en la gestación diabética, con consecuencias deletéreas para el feto. Sin embargo resta analizar las funciones de estos receptores en órganos claves como el corazón y el pulmón fetal y su implicancia durante la gestación diabética a término.

Hipótesis y Objetivos



Hipótesis general

La gestación diabética induce alteraciones del metabolismo lipídico, nitridérgico y oxidativo en el corazón y el pulmón fetal a término, que están vinculadas con anómalos niveles y/o función de los receptores activados por proliferadores peroxisomales α y γ (PPAR α y PPAR γ).

Agonistas de dichos receptores participan en la regulación de parámetros afectados por la patología diabética en corazón y pulmón fetal, como la homeostasis lipídica, la lipoperoxidación y la producción de óxido nítrico.

Hipótesis de trabajo

- ✓ *La patología diabética induce alteraciones en la expresión de los receptores PPAR α y PPAR γ en corazón y pulmón fetal de rata en la gestación a término, anomalías que condicionan el metabolismo lipídico y nitridérgico.*
- ✓ *Agonistas de PPAR α y PPAR γ modulan el metabolismo lipídico en corazón y pulmón fetal de rata diabética a término.*
- ✓ *Agonistas de PPAR α y PPAR γ regulan la producción de NO y lipoperóxidos en corazón y pulmón fetal de rata diabética en la gestación a término.*
- ✓ *El tratamiento dietario materno con aceites enriquecidos en ácidos grasos agonistas de PPAR modula la producción de óxido nítrico y el metabolismo lipídico en el corazón y pulmón fetal de rata diabética.*

Objetivo general

Identificar efectos de la diabetes materna sobre el corazón y el pulmón fetal a término en un modelo experimental de diabetes. Evaluar la función de los receptores PPAR α y PPAR γ y la acción de agonistas de dichos receptores sobre el metabolismo lipídico, la producción de óxido nítrico y la peroxidación lipídica en corazón y el pulmón fetal de ratas sanas y diabéticas.

Objetivos específicos

- 1) Evaluar en el día 21 de gestación de ratas sanas y diabéticas:
 - a. Parámetros metabólicos plasmáticos maternos y fetales.
 - b. En tejido cardíaco fetal: niveles de lípidos, expresión de genes que codifican enzimas limitantes en procesos de oxidación de lípidos, producción de NO, expresión génica de iNOS, niveles de lipoperóxidos y expresión génica de PPAR α y PPAR γ .
 - c. En tejido pulmonar fetal: niveles de lípidos, composición porcentual de ácidos grasos, expresión de genes que codifican enzimas limitantes en procesos de oxidación de lípidos, producción de NO, expresión génica de iNOS, niveles de lipoperóxidos, expresión génica y proteica de PPAR α y PPAR γ .
- 2) Evaluar en el día 21 de gestación, el efecto de la administración *fetal* de LTB₄, agonista endógeno de PPAR α en los últimos tres días de la gestación de ratas sanas y diabéticas sobre:
 - a. Parámetros metabólicos plasmáticos fetales.
 - b. En tejido cardíaco fetal: expresión de genes que codifican enzimas limitantes en la oxidación de lípidos y expresión génica de PPAR α .
 - c. En tejido pulmonar fetal: Expresión de genes que codifican enzimas limitantes en la oxidación de lípidos, expresión génica de PPAR α e iNOS.

- 3) Evaluar en el día 21 de gestación, el efecto de la administración *fetal* de 15dPGJ₂, agonista endógeno de PPAR γ en los últimos tres días de la gestación de ratas sanas y diabéticas sobre:
 - a. Parámetros metabólicos plasmáticos fetales.
 - b. En tejido pulmonar fetal: expresión de genes que codifican enzimas limitantes en la oxidación de lípidos, expresión génica de iNOS y PPAR γ .
- 4) Evaluar en el día 21 de gestación el efecto de la administración de ácidos grasos agonistas de PPAR a través de la dieta materna durante toda la preñez en ratas sanas y diabéticas sobre:
 - a. Parámetros metabólicos plasmáticos maternos y fetales.
 - b. En tejido cardíaco fetal: niveles de lípidos, producción de NO y niveles de lipoperóxidos, expresión génica de PPAR α y PPAR γ y expresión de genes que codifican proteínas que participan en el metabolismo lipídico.
 - c. En tejido pulmonar fetal: niveles de lípidos, producción de NO y composición porcentual de ácidos grasos, expresión génica de PPAR α y PPAR γ y expresión de genes que codifican proteínas que participan en el metabolismo lipídico.

Materiales y Métodos



MATERIALES

Solventes, soluciones y reactivos:

- Ácido acético, etanol absoluto, metanol, isopropanol, éter etílico, acetona, cloroformo, n-hexano, formaldehído, xileno (*MERCK, ANEDRA, BIOPACK o CICARELLI*).
- Medio fosfato salino (PBS): K_2HPO_4 1.5 g/l, KH_2PO_4 0.2g/l, NaCl 7.75 g/l.
- Buffer TAE: Tris Base, EDTA, Ácido acético, pH8-8,2
- Bligh-Dyer (Cloroformo: Metanol, 1:2) (*ANEDRA*).
- Reactivo de Bradford (*BIORAD*), seroalbúmina bovina (BSA) (*SIGMA*).
- Buffer Tris: Tris- HCl, 100 mM, pH 7.4 o 7.6 (*SIGMA*).
- Taq polimerasa, transcriptasa reversa, BufferTaq 5X, agarosa, $MgCl_2$ (*BIODYNAMICS*).
- dNTP's, Cebadores hexámeros al azar, Syber Safe[®], buffer de siembra, RNAlater[®] (*INVITROGEN*).
- Buffer citrato, estreptozotocina (*SIGMA*).
- Ácido tiobarbitúrico (TBA), malondialdehído (1,1,3,3) tetraetoxipropano (MDA) (*SIGMA*).
- Ácido tricloroacético (TCA) (*BAKER*).
- 3,3' diamino-benzidina (DAB) (*SIGMA*).
- Peróxido de hidrógeno (*PARAFARM*).
- LTB_4 , 15dPGJ₂ (*CAYMAN*).
- TRI Reagent[®] (*GENBIOTECH*).
- Anticuerpos primarios anti-PPAR α (*CAYMAN*) y anti-PPAR γ (*SANTA CRUZ*) desarrollados en conejo.
- Anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo biotinilados desarrollados en cabra (*VECTOR LABORATORIES*)

Otros:

- Equipo de determinación de nitratos y nitritos (CAYMAN).
- Equipo de determinación enzimática de glucosa, triglicéridos y colesterol total (*WIENER LAB*).
- Placas para cromatografía en capa delgada de sílica gel preparadas sobre vidrio (MERK).
- Estándares de fosfolípidos, triglicéridos, colesterol, esteres de colesterol (SIGMA).
- Tiras reactivas y glucómetro ACCU-CHEK® (BAYER).
- Aceite de oliva extra virgen (CIUDAD DEL LAGO, PROMET S.A), aceite de cártamo (SAFFLOWER OIL, FLORA INC, EUA)
- Cebadores para PCR (INVITROGEN)
- Portaobjetos cargados (PATHO- GLASS)

Animales:

Ratas hembra y macho de la cepa Wistar fueron adquiridas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales-UBA y mantenidas en el bioterio del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos con alimento balanceado (Asociación Cooperativa Argentina) y agua *ad libitum*, bajo un ciclo de 12 horas de luz - 12 horas de oscuridad, a humedad y temperatura constante de 22 °C. La utilización de los animales de experimentación ha sido llevado a cabo con aprobación del Comité institucional para el uso y cuidado de los animales de laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires y bajo las normas del National Institute of Health (NHI) especificadas en "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" US National Institutes of Health (NIH Publication, 8th Edition, 2011).

Programas de análisis de imagen:

- Image J®.
- ImageProPlus®

Programas de análisis estadístico:

- Graphpad prism 5[©]

METODOLOGÍA

Modelo experimental de diabetes:

La diabetes experimental se indujo mediante la administración de estreptozotocina (90 mg/kg) por medio de una inyección subcutánea en el período neonatal (día 2 de nacimiento) a ratas hembras (Portha *y col.* 1979). La estreptozotocina fue disuelta en buffer citrato, los controles se obtuvieron por administración de vehículo (buffer citrato solo).

En las concentraciones utilizadas, la estreptozotocina se une de forma específica a células β pancreáticas, desencadenando su destrucción. El páncreas neonatal presenta gran capacidad regenerativa y se recupera parcialmente dando lugar a una función pancreática deficiente durante la vida adulta del animal. Las ratas así tratadas presentan hiperglucemias moderadas y una curva de tolerancia a la glucosa alterada (Jawerbaum y White 2010).

El estado diabético fue confirmado posteriormente en animales adultos por medio de la determinación de glucosa en sangre utilizando tiras reactivas y glucómetro ACCU-CHEK[©] (BAYER). La sangre para tal determinación fue obtenida de la vena central de la cola.

Se consideraron diabéticas aquellas ratas que presentaron valores de glucemia en ayunas superiores a 130 mg/dl. Los valores de glucemia de las ratas inyectadas con vehículo fueron iguales o inferiores a 100 mg/dl.

Grupos experimentales:

Las ratas sanas (controles) y diabéticas fueron apareadas con machos sanos. El apareo fue confirmado por la presencia de espermatozoides en el extendido

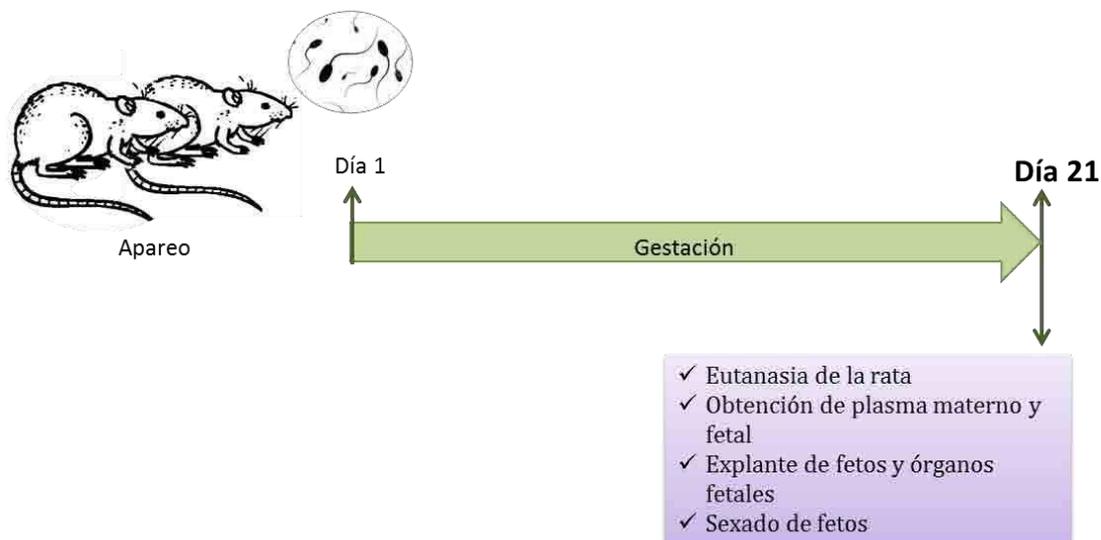
vaginal a la mañana siguiente. Este día fue designado como día 1 de preñez. Para los diferentes objetivos se llevaron a cabo distintos diseños experimentales.

Diseño experimental 1- Estudios en el corazón y el pulmón de fetos de rata diabética en el día 21 de gestación

Para caracterizar el efecto de la diabetes materna sobre órganos fetales, en el día 21 de gestación las ratas sanas y diabéticas fueron sometidas a eutanasia mediante el uso de cámara de CO₂ y posterior decapitación. Los fetos fueron explantados y posteriormente sexados bajo lupa (Esquema 11).

Para las determinaciones plasmáticas, luego de la eutanasia, se obtuvo sangre materna y fetal en tubos heparinizados que fue posteriormente centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos. Se separó el plasma materno y el conjunto de plasmas de fetos hembra y de fetos macho de cada rata y se guardó a -20°C para posteriores análisis.

Bajo lupa se aislaron los corazones y pulmones fetales y se conservaron a -80°C o en RNAlater® (solución estabilizadora de RNA) a -20°C, para posteriores determinaciones.



Esquema 11. *Diseño experimental utilizado para el estudio de los efecto de la diabetes materna en órganos fetales de rata en la gestación a término.*

Diseño experimental 2- Tratamientos in vivo con agonistas endógenos de los receptores PPAR α y PPAR γ en fetos de rata en la gestación a término.

Ratas hembras sanas y diabéticas se sometieron a una breve cirugía en los días 19, 20 y 21 de gestación y durante dicha intervención los fetos fueron inyectados con agonistas de PPAR que se detallarán a continuación (Esquema 12).

La cirugía se llevó a cabo bajo anestesia de CO₂ y se las mantuvo en sedación con vapores de éter. Se realizó una incisión abdominal y se expuso el cuerno uterino izquierdo. Los fetos fueron identificados a partir del ovario izquierdo y se inyectaron a través de la pared uterina de manera subcutánea en el dorso con agonista de PPAR o con vehículo (de forma intercalada) para luego volver a introducir el cuerno uterino dentro de la cavidad abdominal y proceder a suturar al animal. Esta intervención se repitió los días 19, 20 y 21 de gestación y tuvo en promedio una duración de 15 minutos cada vez (Martinez y col. 2011).

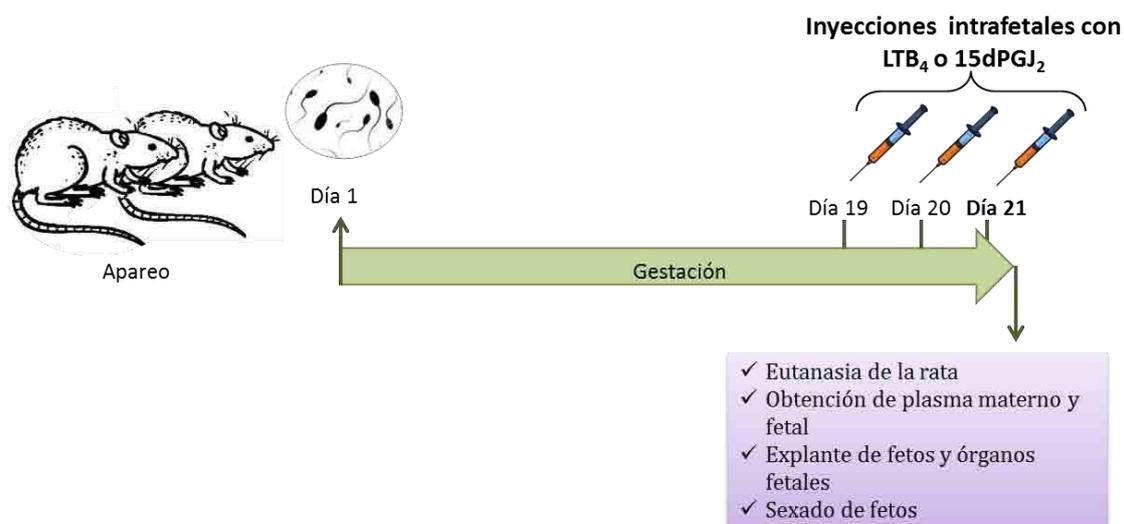
Agonistas de PPAR utilizados:

- Grupos de ratas sanas y diabéticas, fueron sometidas a las cirugías ya descritas y los fetos recibieron LTB₄, agonista de PPAR α (0,1 nmoles de LTB₄/feto, disueltos en solución vehículo) o vehículo (0.3 μ l de etanol/feto, disueltos en solución salina).
- Grupos de ratas sanas y diabéticas, fueron sometidas a las cirugías ya descritas y los fetos recibieron 15dPGJ₂, agonista de PPAR γ (2nmoles de 15dPGJ₂/feto, disueltos en solución vehículo) o vehículo (0.3 μ l de etanol/feto, disueltos en solución salina).

Luego de 3 horas de la última inyección, las ratas preñadas fueron sometidas a eutanasia en cámara de CO₂ y posterior decapitación. Los fetos fueron explantados y posteriormente sexados bajo lupa.

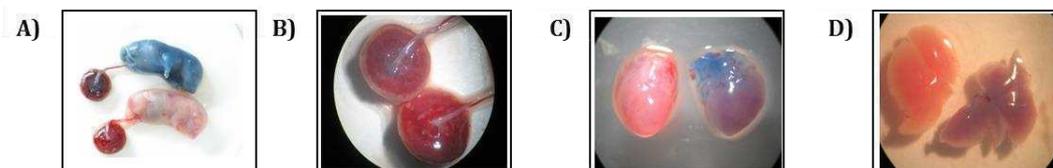
Para las determinaciones plasmáticas, luego de la eutanasia, se obtuvo sangre materna y fetal en tubos heparinizados y fue centrifugada a 10000 rpm por 15 minutos. Se separó el plasma materno y el conjunto de plasmas de fetos hembra y de fetos macho de cada rata y se guardó a -20°C para posteriores análisis.

Bajo lupa se aislaron los corazones y pulmones fetales y se conservaron a -80°C o RNAlater[®] (solución estabilizadora de RNA) a -20°C, para posteriores determinaciones.



Esquema 12. Diseño experimental utilizado para el estudio de los efectos de la administración intrafetal de agonistas de PPAR sobre órganos fetales de rata diabética en la gestación a término.

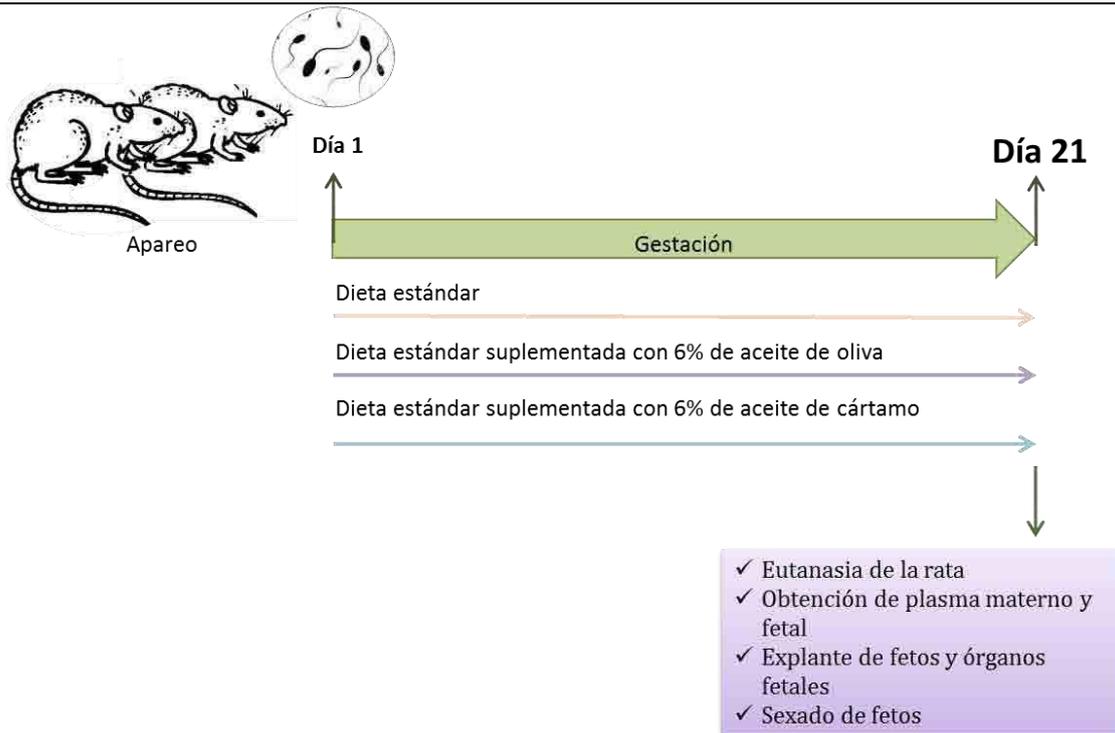
Se realizaron estudios de validación de la técnica de administración intrafetal, para lo cual se administraron inyecciones intrafetales de una solución de azul de Evans de la manera que se detalló anteriormente, a fetos de rata de 21 días de gestación. Luego de 3 horas de dicha administración los animales fueron sometidos a eutanasia en cámara de CO₂ y se extrajeron los fetos. Se observó la coloración azul de los fetos, la placenta, el cordón umbilical y diversos órganos fetales entre ellos corazón y pulmón fetal (Esquema 13). De esta manera se corrobora el alcance y distribución de la sustancia administrada mediante esta técnica.



Esquema 13. Administración intrafetal de azul de Evans en fetos provenientes de ratas de 21 días de gestación. (A) Fetos, (B) Placenta, (C) Corazón fetal, (D) Pulmón fetal.

Diseño experimental 3- Tratamientos dietarios a la rata gestante con alimento suplementado con aceites ricos en ácidos grasos agonistas de PPAR.

Ratas sanas y diabéticas fueron alimentadas hasta el día que se confirmó su preñez (día 1) con alimento estándar. Entre los días 1 y 21 de gestación los animales fueron separados en grupos y recibieron distintas dietas: alimento estándar (grupos controles), alimento estándar suplementado con 6% aceite de oliva o alimento estándar suplementado con 6% aceite de cártamo (Esquema 14).



Esquema 14. Diseño experimental utilizado para el estudio de los efectos de la suplementación dietaria con aceites ricos en ácidos grasos agonistas de PPAR a ratas gestantes sanas y diabéticas.

En las tablas 1 y 2 se muestra la composición nutricional de los alimentos suministrados y la composición de ácidos grasos de cada una de las dietas aplicadas al modelo. Estos datos se obtuvieron a partir de muestras de alimentos analizadas en el Instituto Nacional del Alimento y el Instituto de Tecnología Industrial.

DIETA	carbohidratos (g/100g)	proteínas (g/100g)	grasa (g/100g)	calorías kcal%
Dieta estándar	59	25	5	324
Dieta estándar suplementada con aceite de oliva (6%)	48	24	11	340
Dieta estándar suplementada con aceite de cártamo (6%)	47	23	11	345

Tabla 1 Composición de los alimentos suplementados o no con aceite de oliva o aceite de cártamo, que se administraron a ratas sanas y diabéticas durante toda la gestación.

DIETA	ÁCIDOS GRASOS (g/100 g de alimento)				
	palmítico	esteárico	oleico	linoleico	linolénico
Dieta estándar	0,58	0,16	1,27	1,99	0,73
Dieta estándar suplementada con aceite de oliva (6%)	1,55	0,26	5,77	2,41	0,57
Dieta estándar suplementada con aceite de cártamo (6%)	0,97	0,25	1,81	6,49	0,55

Tabla 2 Contenido de ácidos grasos de los alimentos suplementados o no con aceite de oliva o aceite de cártamo, que se administraron a ratas sanas y diabéticas durante toda la gestación.

En el día 21 de gestación las ratas fueron sometidas a eutanasia en cámara de CO₂ y posterior decapitación. Los fetos fueron explantados y posteriormente sexados bajo lupa.

Para las determinaciones plasmáticas, luego de la eutanasia, se obtuvo sangre materna y fetal en tubos heparinizados y fue centrifugada a 10000 rpm por 15

minutos. Se separó el plasma materno y el conjunto de plasmas de fetos hembra y de fetos macho de cada rata se guardó a -20°C para posteriores análisis.

Bajo lupa se aislaron los corazones y pulmones fetales y se conservaron a -80°C o RNAlater[®] (solución estabilizadora de RNA) a -20°C , para posteriores determinaciones.

DETERMINACIONES

Determinación de proteínas:

Los niveles de proteínas presentes en las distintas muestras fueron medidos mediante la técnica de Bradford (Bradford 1976). Se tomó una alícuota de $10\ \mu\text{l}$ de tejido homogeneizado en buffer PBS 1X, y se realizó una dilución 1:10 con solución salina. Se tomó $10\ \mu\text{l}$ de la misma, a la cual se le adicionó $800\ \mu\text{l}$ de solución salina y $200\ \mu\text{l}$ de reactivo de Bradford.

Luego se determinó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de $595\ \text{nm}$.

La concentración proteica de la muestra fue determinada mediante la comparación con una curva de calibración utilizando seroalbúmina bovina en diferentes concentraciones como estándar.

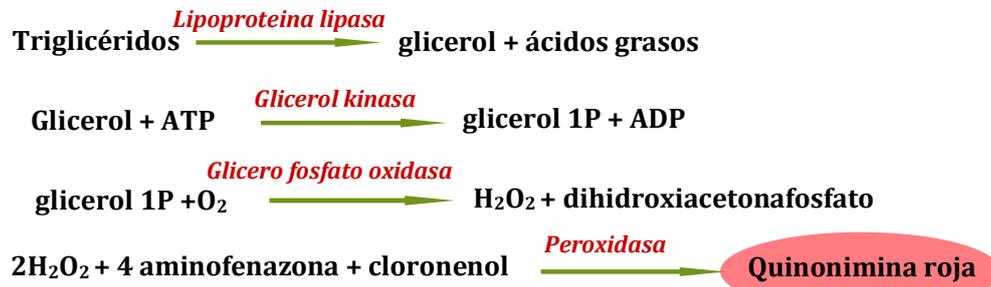
Determinaciones plasmáticas

Se determinaron los valores de glucosa, colesterol total y triglicéridos en plasma materno y fetal de ratas. Para ello se utilizaron equipos comerciales (WIENER LAB) cuyas determinaciones se basan en la transformación de los sustratos a medir, por medio de enzimas específicas, en productos coloreados que pueden ser cuantificados por su absorbancia.

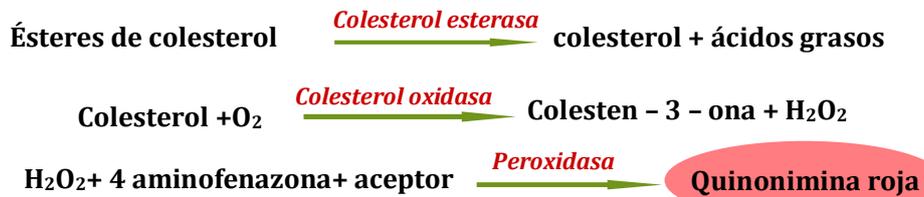
La medición de la glucemia en plasmas maternos y fetales de los diferentes grupos experimentales se basa en la siguiente reacción colorimétrica:



La medición de la trigliceridemia en plasmas maternos y fetales de los diferentes grupos experimentales se basa en la siguiente reacción colorimétrica:



La medición de la colesterolemia en plasma materno de los diferentes grupos experimentales se basa en la siguiente reacción colorimétrica:



Para cada tipo de determinación se adicionó 10 µl de plasma de cada muestra y de estándares correspondientes provistos por el equipo, 1 ml de reactivo de trabajo, el cual contiene las enzimas y sustratos necesarios para la reacción de interés y se llevó a un baño a 37°C por 10 minutos. Luego se enfriaron las muestras y los estándares y se midió la absorbancia a 505 nm, longitud de onda a la cual absorben los productos de las reacciones enzimáticas. Finalmente se obtuvieron las concentraciones de glucemia en mg/dl y de trigliceridemia y colesterolemia en g/l.

Determinación de los niveles de lípidos tisulares:

Se realizó una extracción de lípidos de tejidos fetales utilizando el método de Bligh y Dyer (Bligh y Dyer 1959). Para la determinación de lípidos en pulmón fetal se tomó un pulmón fetal y se lo homogeneizó en 1 ml de buffer PBS. Para la determinación de lípidos en corazón fetal se tomaron 3 corazones de fetos del mismo sexo y de la misma rata, y se homogeneizaron en 500 µl de PBS. 500 µl del homogenato de pulmón y 470 µl de homogenato de corazón fueron sometidos a

dos extracciones con 3.5 ml de la mezcla de solventes Bligh y Dyer (metanol: cloroformo 2:1). El volumen de extracción se particionó con 1 ml de agua y 1 ml de cloroformo. Se centrifugó a 3000 rpm a 4°C durante 10 minutos. La fase acuosa se descartó y la fase orgánica se evaporó a sequedad en estufa de vacío. El residuo se reconstituyó en 1 ml de la mezcla de Bligh y Dyer.

La separación de las distintas especies lipídicas presentes en los extractos se llevó a cabo mediante cromatografía en capa delgada en placas de sílica gel previamente lavadas con acetona. En ella se sembraron volúmenes de 400 µl de extracto de las muestras de pulmón y 600 µl de extracto de las muestras de corazón fetal. En cada placa se sembraron mezcla de estándares de cantidades conocidas de cada especie lipídica a analizar, como curva de calibración.

El desarrollo de la placa se llevó a cabo con la mezcla de solventes hexano: éter etílico: ácido acético (80:20:20 v/v/v). Posteriormente, se reveló la presencia de las distintas especies lipídicas en la placa con vapores de yodo. El yodo se combina con las moléculas hidrofóbicas evidenciando la presencia de lípidos en la placa como manchas marrones. Las placas fueron digitalizadas mediante escáner y se analizó la intensidad de las manchas marrones de cada muestra utilizando el software Image J. Los valores obtenidos se refirieron a la curva de estándares sembrados en la misma placa y se expresaron como µg/mg de proteína en la correspondiente muestra.

Determinación de la composición porcentual de ácidos grasos tisulares:

Para establecer la composición porcentual de los ácidos grasos en las muestras de pulmones se procedió con la extracción de lípidos antes detallada, con la diferencia que la fase orgánica resultante de la extracción se evaporó a sequedad con nitrógeno gaseoso.

Los lípidos totales fueron tratados con un 5% de HCl en metanol a 70°C durante dos horas. Se dejó enfriar y se agregó agua y los metil ésteres de ácido grasos (FAMES) fueron extraídos con cloroformo.

Los FAMES se analizaron por cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masa en un equipo Shimadzu GCMS-QP5050 A usando Helio

como gas carrier, equipado con una columna capilar Ultra 2 (50 m x 0,2 mm I.D., 0,11 μm) (Careaga y col. 2013).

El inyector y el detector de temperaturas fueron establecidos a 280°C, la temperatura de la columna fue programada desde 100°C a 280°C a una velocidad de 5°C / min y 10 min a 280°C.

Los FAMES fueron también analizados por cromatografía gaseosa en un equipo Thermo Focus CG equipado con un detector de ionizador de llama y con una columna capilar Omegawax 250 (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 μm).

En este caso el gas utilizado como carrier fue el Nitrógeno. El inyector fue programado a 220°C y el detector a 275°C. La temperatura de la columna fue de 150°C durante 1 min. Y luego se realizó un rampa a una velocidad de 15°C / min hasta 200°C y se realizó una segunda rampa a 2°C / min hasta 250°C.

Los componentes individuales se identificaron utilizando un espectrómetro de masa y mediante la comparación de los datos de tiempo de retención con los obtenidos para patrones auténticos de laboratorio (SIGMA).

La cuantificación se realizó por comparación del porcentaje del área bajo la curva de cada uno de los picos de FAMES en el cromatograma y los de un estándar conocido, expresando el resultado como porcentaje sobre el total de ácidos grasos.

Determinación de los niveles de lipoperóxidos:

Los lipoperóxidos se evaluaron mediante el dosaje de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS). La oxidación de lípidos genera reacciones en cadena que conducen a la formación de hidroperóxidos, los cuales se descomponen en diferentes productos secundarios, entre ellos el malondialdehído (MDA). Este compuesto puede cuantificarse mediante una técnica colorimétrica en la cual el MDA reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA), dando como producto una base de Schiff que absorbe a 532 nm y se puede medir por espectrofotometría.

Para la medición se utilizó un pulmón fetal o dos corazones fetales homogeneizados en 1 ml de buffer Tris-HCl 100mM pH 7,6. Se centrifugaron los homogenatos a 3000 rpm por 10 minutos. A 250 μl del sobrenadante se le adicionaron 250 μl de ácido tricloroacético (40% v/v) y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. A 300 μl del sobrenadante se le agregó 170 μl de ácido

tiobarbitúrico (46 nM). Esta solución se calentó a 95°C por 15 minutos e inmediatamente se enfriaron las muestras. El color desarrollado durante la reacción se midió en espectrofotómetro a 530 nm. Se procesaron distintas concentraciones de MDA en idénticas condiciones que las muestras de tejidos para obtener una curva estándar. Los resultados se expresaron como nmoles de TBARS/mg de proteína.

Determinación de los niveles de nitratos/nitritos:

Para evaluar la producción de óxido nítrico, se utilizó el dosaje de los nitratos/nitritos. El óxido nítrico es un agente altamente reactivo y de vida media muy corta, que tras su rápida oxidación, produce nitratos y nitritos. Éstos últimos son metabolitos estables que pueden ser medidos en los tejidos. Se considera que el dosaje de los nitratos/nitritos es un índice de la producción de NO.

Para la medición se utilizó un pulmón fetal o dos corazones fetales homogeneizados en 1 ml de buffer Tris- HCl 100mM pH 7,6. Se centrifugaron los homogenatos a 3000 rpm por 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y los nitratos presentes en él se redujeron a nitritos por medio de la enzima nitrato reductasa. Los nitratos totales de la muestra se cuantificaron por el método de Griess (Green y col 1982) utilizando un equipo comercial. Los productos de la reacción colorimétrica se cuantificaron en espectrofotómetro a 540 nm. En el mismo ensayo y en idénticas condiciones se procesaron concentraciones conocidas de nitratos como estándares. Los resultados se expresaron en nmoles de nitratos-nitritos/mg de proteína.

Determinación de expresión génica de PPAR α , PPAR γ , ACO, CPT1, iNOS, FAS, FAT y ABCA1:

La determinación de la expresión génica de PPAR α , PPAR γ , ACO, CPT1, iNOS, FAS, FAT, ABCA1, se realizó mediante RT-PCR.

Extracción de ARN tisular:

Los corazones y pulmones fetales de rata fueron conservados en solución estabilizadora de ARN (RNA Later[®]) y guardada a -20 °C hasta su utilización.

Para la extracción de ARN se homogeneizó un corazón fetal de rata en 500 µl de TRI Reagent®, se le agregó 100 µl de cloroformo y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4°C. Se separó la fase acuosa a la que se le agregó 250 µl de isopropanol. Se dejó 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000g por 10 minutos a 4°C.

Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó 3 veces con 1 ml de etanol 75%, se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, el pellet se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 25 µl de agua estéril.

Para la extracción de ARN de pulmón fetal de rata se homogeneizó un pulmón en 1 ml de TRI Reagent®, se le agregó 200 µl de cloroformo y se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4°C. Se separó la fase acuosa a la que se le agregó 500 µl de isopropanol. Se dejó 10 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó a 12000g por 10 minutos a 4°C.

Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó 3 veces con 1 ml de etanol 75%, se centrifugó a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, el pellet se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de agua estéril.

En todos los casos se cuantificó la concentración de ARN presente en las distintas muestras (µg/µl) mediante espectrofotometría, utilizando el equipo NANODROP 1000®. Se seleccionaron para utilizar posteriormente las muestras cuya relación de absorbancia 260/280 nm estuviera entre 1,8 y 2, utilizando esta relación como índice de pureza.

Transcripción reversa del ARN:

La obtención del ADN copia (ADNc) se realizó mediante la transcripción reversa utilizando 1 µg de ARN obtenido de las extracciones de corazón o pulmón fetal, la enzima transcriptasa reversa (M-MLV, PROMEGA), cebadores hexámeros al azar y los cuatro dNTPs. La transcripción reversa se llevó a cabo en las siguientes condiciones: 5 minutos a 70°C, 60 minutos a 37°C y 15 minutos a 70°C.

Amplificación del ADNc mediante PCR:

A partir del ADNc obtenido, se amplificaron segmentos específicos de los genes que se deseaban evaluar, mediante el uso de cebadores específicos cuyas secuencias y longitud de producto de amplificación se detallan en el Tabla 3.

Gen	Secuencia	Longitud del amplicón (pb)
PPARα	Sentido: 5'-TCACACAATGCAATCCGTTT-3' Anti-sentido: 5'-GGCCTTGACCTTGTTTCATGT-3'	177
PPARγ	Sentido: 5'-CATGCTTGTGAAGGATGCAAG-3' Anti-sentido: 5'-TTCTGAAACCGACAGTACTGACAT-3'	131
ACO	Sentido: 5'-CCAATCACGCAATAGTTCTGG-3' Anti-sentido: 5'-CGCTGTATCGTATGGCGAT-3'	363
CPT1	Sentido: 5'-TATCGTCCGACATTAGACCGT-3' Anti-sentido: 5'-CATCTATGACCTCCTGGCACT-3'	715
iNOS	Sentido: 5'-TGGTGAAGGGTGTCTGAAA-3' Anti-sentido: 5'-CTCACTGGGACTGCACAGAA-3'	128
FAS	Sentido: 5'-CTTGGGTGCCGATTACAACC-3' Anti-sentido: 5'-GCCCTCCCGTACTCACTC-3'	163
FAT	Sentido: 5'-CTCTGACATTTGCAGGTCCA-3' Anti-sentido: 5'-CACAGGCTTTCCTTCTTTGC-3'	214
ABCA1	Sentido: 5'-CAGGCTGATGTCAGTCTCCA-3' Anti-sentido: 5'-GGCTTCAGGATGTCCATGTT-3'	194
L30	Sentido: 5'-CCATCTTGGCGTCTGATCTT-3' Anti-sentido: 5'-GGCGAGGATAACCAATTTTC-3'	201

Tabla 3. Cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos de genes de interés.

Para llevar a cabo la PCR se utilizó GoTaq® Polimerasa (Promega), Buffer Taq 5X, MgCl₂, los 4 dNTPs, los cebadores específicos y 2 µg del ADNc obtenido por transcripción reversa.

Como control interno, en cada PCR y para cada muestra, se amplificó una porción del gen de la proteína ribosomal L30, al cual se refirieron los resultados de cada gen de interés.

La PCR para las muestras de corazón fetal de rata, se llevó a cabo en las siguientes condiciones: un ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 33 ciclos para PPAR α , 36 ciclos para PPAR γ , 33 ciclos para ACO, 34 ciclos para CPT1, 34 ciclos para iNOS y 26 ciclos para L30. Cada ciclo consistió en desnaturalización a

95°C por 15 segundos, apareamiento de cebadores a 58°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 15 segundos.

La PCR para las muestras de pulmón fetal de rata, se llevó a cabo en las siguientes condiciones: un ciclo inicial de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos para PPAR α , 35 ciclos para PPAR γ , 34 ciclos para ACO, 34 ciclos para CPT1, 32 ciclos para FAS, 29 ciclos para FAT, 28 ciclos para ABCA1, 35 ciclos para iNOS y 25 ciclos para L30. Cada ciclo consistió en desnaturalización a 95°C por 15 segundos, apareamiento de cebadores a 58°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 15 segundos.

Los productos de la PCR se separaron por electroforesis en geles de agarosa (2% en buffer TAE 1X) teñidos con SYBER Safe[®] (5%).

El revelado y la digitalización de la imagen se llevó a cabo bajo luz UV en el equipo Image Quant[®] (GE HEALTHCARE). Las bandas correspondientes a los productos de amplificación se cuantificaron densitométricamente con el programa Image J. La cuantificación de la intensidad de banda correspondiente a cada gen en cada muestra se relativizó a la intensidad de banda del producto de amplificación del gen L30 en la misma muestra.

Determinación de los niveles proteicos de PPAR α y PPAR γ :

Por medio de técnicas inmunohistoquímicas se analizó la expresión proteica de PPAR α y PPAR γ en pulmones de fetos de ratas sanas y diabéticas. Los pulmones fetales explantados en el día 21 de gestación fueron fijados en formol (4% en PBS). Luego, el tejido fue deshidratado por pasajes en etanol en proporciones crecientes (70%, 80%, 90%, 100%) de 10 minutos cada uno y finalmente en xileno. Luego de la deshidratación se embebió e incluyó en parafina.

El tejido se cortó en micrótopo seriado en secciones de 5 μ m y éstas fueron montados en portaobjetos cargados. El tejido fue rehidratado por pasajes en xileno y etanol en proporciones decrecientes (100%, 90%, 80%, 70%) por 10 minutos cada uno y finalmente agua destilada.

Se realizó el desenmascaramiento de antigénico colocando los portaobjetos con los cortes en buffer citrato (10 mM, pH 6), se calentó por 10 minutos a 95°C. Luego se lavó con PBS.

Luego se colocaron los portaobjetos con los cortes en peróxido de hidrógeno (3% en PBS) por 20 minutos, para el bloqueo de peroxidasas endógenas. A continuación se lavó 3 veces con PBS y PBS-T.

Se incubó con anticuerpos primarios desarrollados en conejo antiPPAR α (1:300) o anti PPAR γ (1:50) diluidos en BSA 1% en PBS-T, durante 24 horas en cámara húmeda. Los controles negativos se realizaron sin anticuerpo primario, incubando sólo BSA 1% en PBS-T.

Luego de la incubación con el anticuerpo primario se lavaron los cortes con PBS y PBS-T y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo biotilado (1:200 en PBS-T) durante 1 hora en cámara húmeda. Se realizaron controles negativos sin anticuerpo secundario.

Se lavaron los cortes con PBS y PBS-T, se le adicionó el complejo avidina-biotina y se incubó por 1 hora en cámara húmeda.

A continuación se lavaron los cortes con PBS y luego buffer Tris 0.05M pH 7,6. Se realizó el revelado de los anticuerpos con 3,3' diamino-benzidina (DAB) por 10 minutos, evidenciándose color marrón donde se unió el anticuerpo.

Posteriormente se procedió a la deshidratación de los cortes en pasajes en etanol en concentraciones crecientes (70%, 80%, 90%, 100%) por 10 minutos cada una y finalmente en xileno. Los cortes fueron montados con entellan.

La intensidad de la inmunoreactividad de PPAR α y PPAR γ en pulmones fetales se midió utilizando un microscopio Axiophot Zeiss con campo claro, acoplado a una cámara fotográfica conectada al programa Canon Remote Capture. Posteriormente las imágenes fueron analizadas con el programa ImageProPlus. Para evaluar la densidad óptica se tomó un área de igual dimensión para todas las muestras, la cual se repitió 3 veces por campo, tomando 3 campos por corte y se tomaron 3 cortes de cada muestra.

Los valores de intensidad se relativizaron al valor medio de cada PPAR en el pulmón de fetos hembra de ratas controles, al cual se le asignó el valor 1.

Análisis estadístico

Los valores presentados fueron comparados empleando el test t de Student o ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni, según correspondiese. Para el

análisis estadístico se utilizó el programa Graphpad prism 5. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando p fue menor o igual a 0,05.

Resultados



CAPÍTULO I

Diabetes en la gestación: características del modelo experimental utilizado

Para los estudios presentados en este trabajo de tesis se utilizó un modelo de diabetes experimental en rata ampliamente caracterizado durante la gestación por nuestro grupo de trabajo (Jawerbaum y White 2010). Se trata de un modelo de diabetes moderada, que se obtiene, tal como se detalló en materiales y métodos, por la administración neonatal de estreptozotocina. Al administrar esta droga en el día 2 de nacimiento, se produce la destrucción de células β pancreáticas y una posterior regeneración parcial del páncreas. Esto conduce al desarrollo de un animal adulto con una deficiente función pancreática y en consecuencia menor secreción de insulina. Los valores de glucemia obtenidos en las ratas adultas rondan los 200 mg/dl, valores similares a los que se encuentran con frecuencia en las pacientes gestantes diabéticas debido a las dificultades en conseguir un apropiado control metabólico.

Para los distintos abordajes experimentales, ratas sanas y diabéticas se pusieron en apareo con machos sanos y se designó como día 1 de gestación el día en que se encontraron espermatozoides en el extendido vaginal. Los animales se sometieron a eutanasia en día 21 de gestación para el estudio de los corazones y pulmones en la gestación a término.

Características de las ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación y de sus fetos.

Los resultados obtenidos mostraron que los valores de glucemia basal de las ratas diabéticas fueron mayores en comparación con los encontrados en ratas sanas ($p < 0,001$, Tabla 4 A), así como también la glucemia de fetos de ratas diabéticas fue mayor que en los fetos de ratas sanas ($p < 0,001$, Tabla 4 B). Se observó también un incremento de la trigliceridemia materna y fetal en el grupo de ratas diabéticas respecto al grupo control ($p < 0,01$, Tabla 4 A y B).

Los valores de colesterolemia materna fueron mayores en las ratas del grupo diabético comparadas con el grupo control ($p < 0,01$, Tabla 4 A)

La insulinemia materna se encontró disminuida en las ratas del grupo diabético en comparación al grupo control ($p < 0,05$, Tabla 4 A).

Al analizar parámetros plasmáticos se encontró que no había diferencias sexo-dependientes en los fetos de ratas en el grupo control ni en el grupo diabético, en lo que respecta a los valores de glucemia y trigliceridemia.

Se evaluó el peso fetal en el día 21 de gestación y se encontró que el estado diabético incrementó el peso tanto en los fetos hembra ($p < 0,01$) como de los fetos macho ($p < 0,001$), en comparación con sus respectivos controles (Tabla 4 B).

Similar a lo encontrado en el peso fetal, el peso de los pulmones fetales fue mayor en el grupo diabético respecto al control tanto en fetos hembra como en fetos macho ($p < 0,01$, Tabla 4 B).

Por otra parte se observó que peso fetal y el peso del pulmón fetal fueron mayores en los fetos machos comparados con las hembras en el grupo control y en el grupo diabético ($p < 0,01$, Tabla 4 B).

Cuando se analizó la relación *peso pulmón fetal/peso fetal*, no se encontraron diferencias en hembras y machos del grupo control ni del grupo diabético (Tabla 4 B).

En cuanto al peso de corazón fetal, se observó que los corazones de fetos de ratas diabéticas presentaron mayor peso que los corazones de fetos de ratas sanas ($p < 0,05$), sin que se encontraran diferencias sexo-dependientes en el grupo control ni en el grupo diabético (Tabla 4 B). Al analizar la relación *peso corazón fetal/peso fetal*, no

se observaron diferencias entre el grupo control y el grupo diabético en los fetos macho ni en los fetos hembra (Tabla 4 B).

(A) Datos maternos	Control	Diabético
Glucemia (mg/dl)	93±7 ^a	215±23 ^b
Trigliceridemia (g/l)	2,1±0,3 ^a	4,1±0,3 ^b
Colesterolemia (g/l)	1,15±0,10 ^a	1,76±0,11 ^b
Insulinemia (ng/ml)	1,35±0,06 ^a	1,13±0,05 ^b

(B) Datos fetales	Control		Diabético	
	<i>Hembra</i>	<i>Macho</i>	<i>Hembra</i>	<i>Macho</i>
Glucemia (mg/dl)	44±3 ^a	45±4 ^a	149±7 ^b	146±12 ^b
Trigliceridemia (g/l)	0,53±0,08 ^a	0,54±0,05 ^a	0,92±0,08 ^b	0,89±0,08 ^b
Peso fetal (g)	2,98 ± 0,02 ^a	3,15 ± 0,04 ^b	3,33 ± 0,04 ^c	3,56 ± 0,05 ^d
Peso pulmón fetal (mg)	90 ± 1,2 ^a	101 ± 1,7 ^b	99 ± 1,7 ^b	109 ± 2,1 ^c
Peso pulmón fetal/peso fetal (mg/g)	30 ± 1 ^a	32 ± 2 ^a	30 ± 1 ^a	31 ± 2 ^a
Peso corazón fetal (mg)	24,5 ± 0,4 ^a	26,0 ± 0,5 ^{ab}	26,4± 0,5 ^{bc}	28,0± 0,6 ^c
Peso corazón fetal/peso fetal (mg/g)	8,2±0,6 ^a	8,2±0,6 ^a	7,92±0,5 ^a	7,86±0,4 ^a

Tabla 4. Parámetros metabólicos maternos y fetales, pesos fetales y del corazón y pulmón fetal en el día 21 de gestación en grupos de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media ± error estándar obtenido de 12 ratas en cada grupo experimental. **(A)** Parámetros maternos, test estadístico: t-student. **(B)** Parámetros fetales. Se evaluó el conjunto de plasmas de todos los fetos hembra o todos los fetos macho de cada rata. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las diferentes letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

CAPÍTULO II

Alteraciones en el corazón de fetos de rata diabética en la gestación a término.



La diabetes es una patología que se asocia a disfunción cardíaca vinculada a alteraciones estructurales y funcionales en el corazón y la vasculatura. Dichas alteraciones se producen, al menos en parte, como consecuencia de incrementados niveles de especies reactivas del oxígeno y desórdenes metabólicos, como la hiperglucemia e hiperlipidemia propias de la patología diabética (Palomer y col. 2013).

Diversos estudios señalan que en la gestación diabética los elevados niveles de lípidos circulantes maternos, se traducen en la acumulación de lípidos en la placenta y diversos órganos fetales tanto en humanos como en modelos de diabetes experimental (Martinez y col. 2011a, Martinez y col. 2011b, Capobianco y col. 2013).

Estudios en modelos experimentales evidencian que en la gestación diabética se encuentra incrementada la incidencia de alteraciones morfológicas y funcionales del corazón fetal (Molin y col. 2004).

La incrementada transferencia de sustratos metabólicos de la madre al feto, además de condicionar el desarrollo de distintos órganos, conduce a una programación intrauterina de diversas enfermedades que se evidenciarán en la vida adulta del neonato tales como diabetes de tipo 2 y desórdenes cardiovasculares (Simeoni y Barker 2009, Higa y Jawerbaum 2013)

Dados estos antecedentes resultó de interés evaluar en el corazón fetal de ratas diabéticas distintos parámetros metabólicos e indicadores de daño tisular que podrían estar afectando a este órgano en la gestación a término para poder luego comenzar a dilucidar posibles vías que regulen estas anomalías en la gestación diabética.

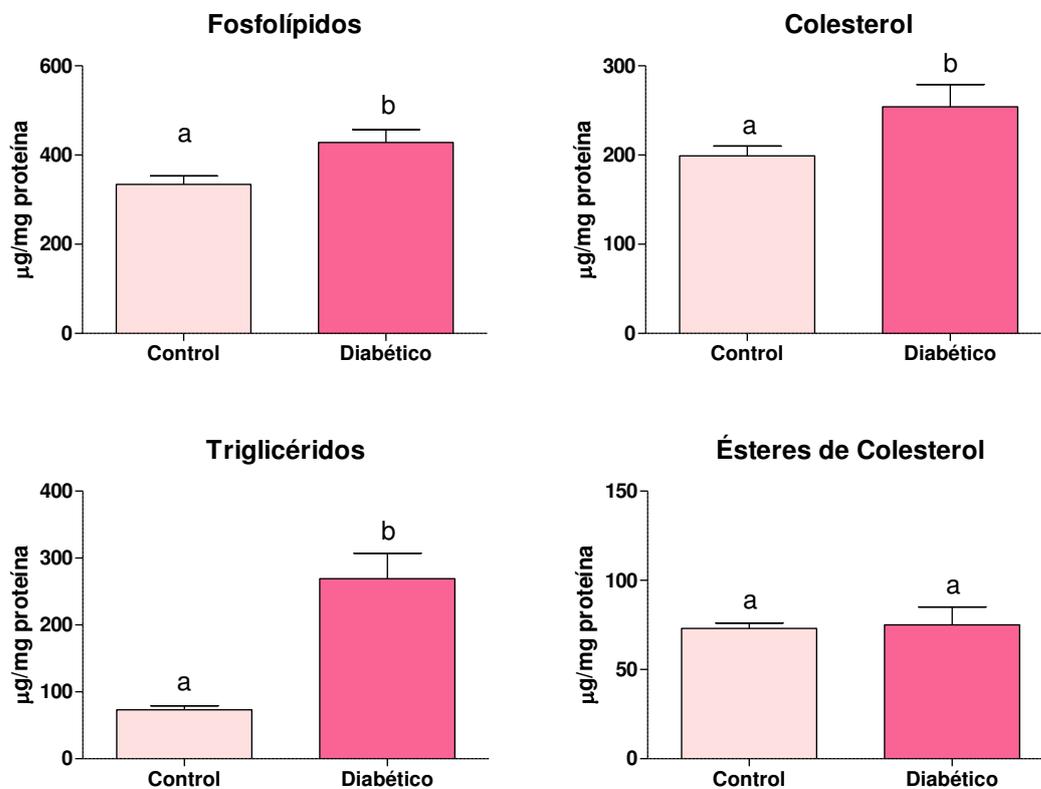
Concentración de especies lipídicas en corazones de fetos macho y hembra de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

Se inició el estudio de este órgano fetal analizando el contenido de diferentes especies lipídicas en corazones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas luego de su extracción y separación por cromatografía en capa delgada (TLC).

En los corazones de fetos hembra de ratas diabéticas se observó un aumento de la concentración de fosfolípidos ($p < 0,05$), colesterol ($p < 0,05$) y triglicéridos ($p < 0,001$) respecto del control (FIG 1 A).

Similar a lo observado en los corazones de fetos hembra, en los corazones de fetos macho del grupo diabético se encontraron aumentadas las concentraciones de fosfolípidos ($p < 0,05$), colesterol ($p < 0,01$), ésteres de colesterol ($p < 0,05$) y triglicéridos ($p < 0,001$), encontrándose también elevadas las concentraciones de ésteres de colesterol ($p < 0,01$) (FIG 1 B).

(A) Corazones de fetos hembra



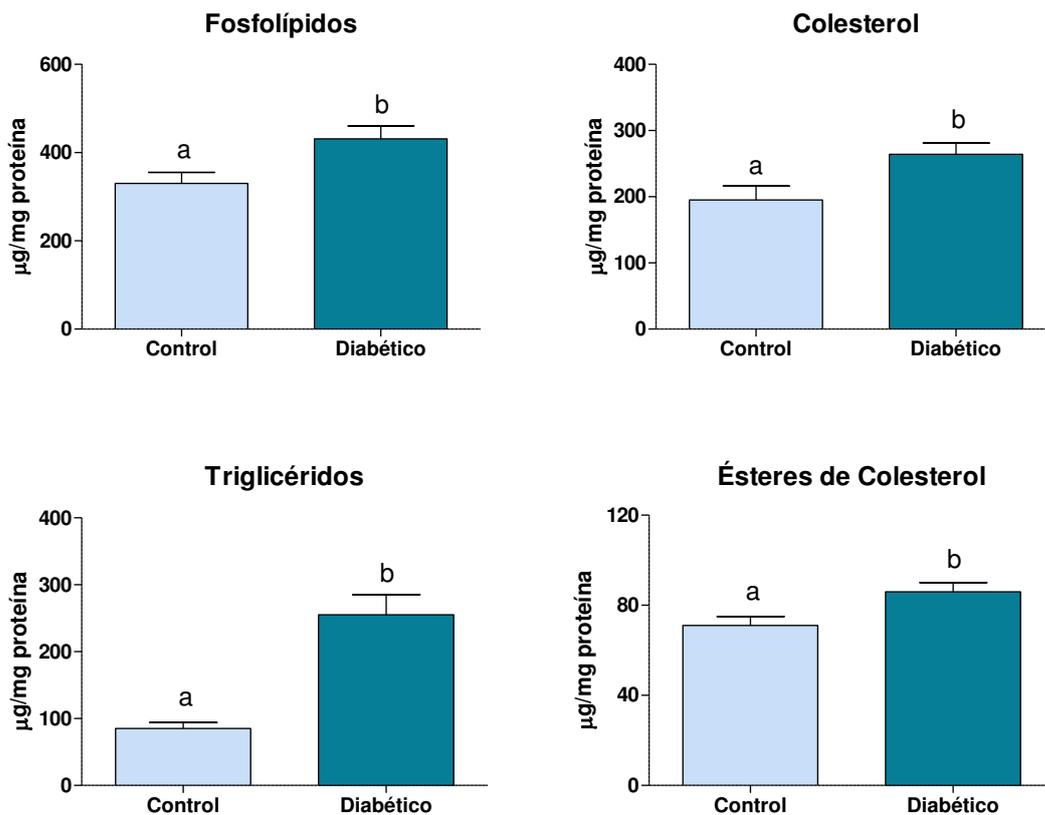
(B) Corazones de fetos macho

FIGURA 1. Concentraciones de lípidos en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: *t*-Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Expresión génica de enzimas involucradas en la oxidación de lípidos en corazones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

El aumento de la concentración de diversas especies lipídicas suscitó nuestro interés en el análisis de vías de oxidación de lípidos, con el fin de determinar posibles alteraciones que conduzcan al aumento de lípidos en el corazón fetal de rata diabética. Es por ello que se analizó, mediante la técnica de RT-PCR, la expresión génica de AcilCoA oxidasa (ACO) y de Carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), ambas enzimas claves en la oxidación (peroxisomal y mitocondrial respectivamente) de lípidos.

Al analizar los niveles de ARN mensajero de ACO, se encontró que en los corazones de fetos hembra no había diferencias entre el grupo control y diabético (FIG 2 A), mientras que los corazones de fetos macho del grupo diabético presentaron una disminución en la expresión génica de ACO ($p < 0,001$, FIG 2 B).

Asimismo, la expresión génica de CPT1 se encontró disminuida en los corazones de fetos hembra ($p < 0,05$) y macho ($p < 0,001$) de ratas diabéticas comparadas con el grupo control (FIG 2 C y D).

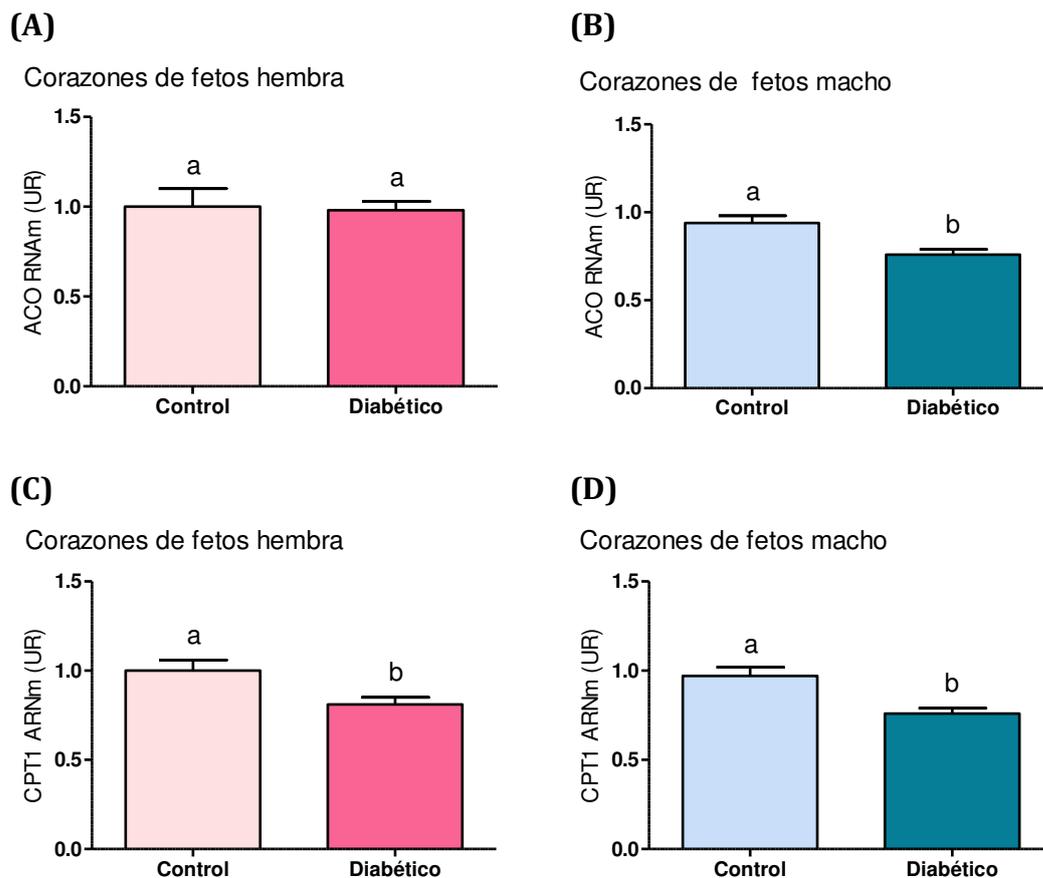


FIGURA 2. Expresión génica de AcilCoA Oxidasa y Carnitina palmitoil transferasa 1 en corazones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas. Expresión génica de ACO en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas. Expresión génica de CPT1 en corazones de fetos hembra (C) y macho (D) de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media \pm error estándar; $n=8$ corazones fetales provenientes de distintas ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: *t*-Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Producción de óxido nítrico y lipoperoxidación en corazones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

La diabetes durante la gestación genera un estado pro-oxidante y pro-inflamatorio que se evidencia en la placenta y distintos órganos fetales, el cual puede generar daño tisular por diferentes mecanismos (Lappas *y col* 2011). Incrementados niveles de NO y lipoperóxidos se han encontrado en la placenta y órganos fetales de rata diabética (Capobianco *y col.* 2008b, Martínez *y col.* 2011a).

Por ello, fue de interés evaluar parámetros de estrés nitrativo y oxidativo como la sobreproducción de óxido nítrico y los niveles de lipoperóxidos en corazones fetales de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

Como índice de la producción de óxido nítrico se dosaron los niveles de nitratos-nitritos, metabolitos estables resultantes de la oxidación del NO.

Se observó que el estado diabético de las ratas gestantes incrementó la producción de NO en los corazones de fetos hembra ($p < 0,05$) y en los corazones de fetos macho ($p < 0,01$) en el día 21 de gestación en comparación con sus respectivos controles (FIG 3 A y B)

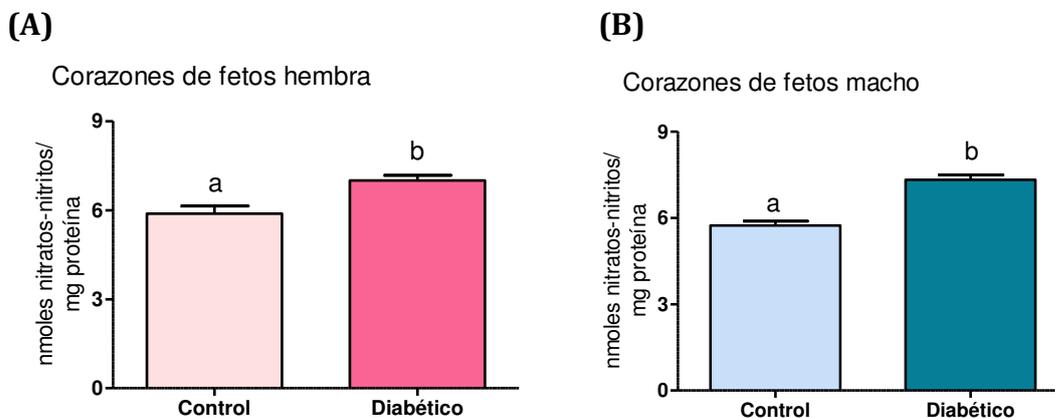


FIGURA 3. Producción de NO en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas. Dosaje de nitratos-nitritos en corazones fetales. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: *t*-Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Para evaluar el daño oxidativo a lípidos se midieron los niveles de TBARS, como índice de la producción de especies reactivas del oxígeno.

Se encontró que los corazones de fetos hembra del grupo control y del grupo diabético no presentaron diferencias en los niveles de TBARS (FIG 4 A), mientras que en los fetos macho, los niveles de TBARS en el corazón fueron mayores en el grupo diabético respecto del control ($p < 0,01$, FIG 4 B)

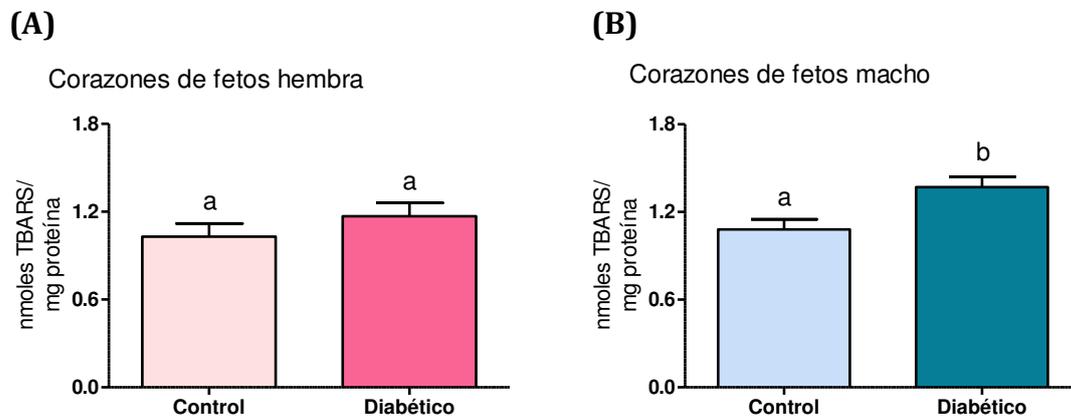


FIGURA 4. Niveles de lipoperóxidos en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas. Dosaje de TBARS en corazones fetales. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: *t*-Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Expresión génica de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en corazones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

Los resultados mostrados previamente muestran un aumento de la producción de NO y de lipoperóxidos en el corazón fetal como consecuencia del estado diabético materno. El desbalance redox generado por la hiperglucemia puede conducir a una alteración en la expresión de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

Fue de interés evaluar la expresión génica de la iNOS, mediante RT-PCR, en el corazón de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

Se observó que no hay diferencias en los niveles de ARN mensajero de iNOS en corazones de fetos macho ni hembra de los grupos diabéticos en comparación a los respectivos controles (FIG 5 A y B).

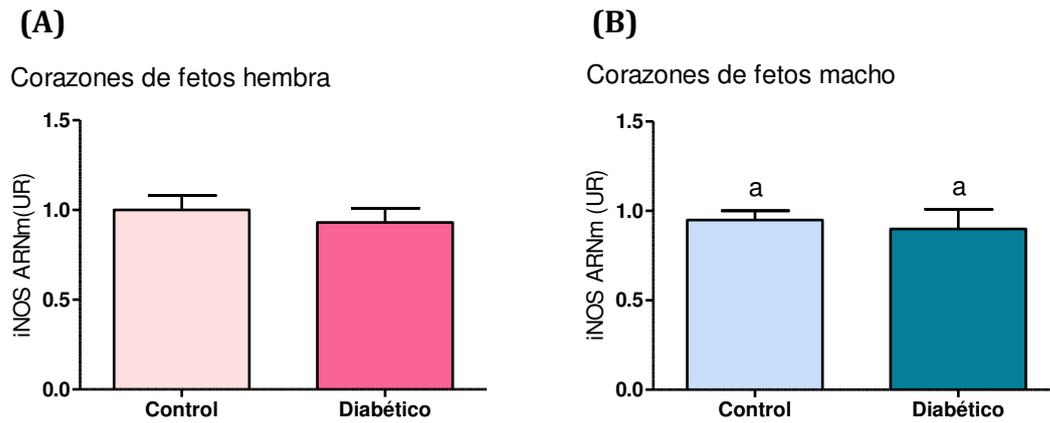


FIGURA 5. *Expresión génica de iNOS en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas.* Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ corazones fetales provenientes de distintas ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: *t-Student.* Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Expresión génica de PPAR α y PPAR γ en corazones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

Considerando las anomalías en el metabolismo lipídico y los parámetros vinculados al estrés oxidativo y nitrativo identificados en el corazón fetal de rata diabética, resultó de interés evaluar la expresión génica de los receptores PPAR. Estos receptores nucleares activados por ligando integran y regulan funciones relacionadas con la homeostasis metabólica y los procesos anti-oxidantes y anti-inflamatorios en diversos tejidos incluido el corazón (Wahli y Michalik 2012) y su función está alterada en la cardiopatía diabética (Lee y col. 2013).

Se analizó la expresión génica de los receptores PPAR α y PPAR γ en corazones fetales en el día 21 de gestación por medio de RT-PCR semicuantitativa.

Se observó que no hay diferencias en los niveles de ARN mensajero de PPAR α en los corazones de fetos hembras entre el grupo control y el grupo diabético (FIG 6 A) mientras que en los corazones de fetos machos de ratas diabéticas se encontró disminuida la expresión génica de este receptor respecto a los corazones de fetos de ratas sanas ($p < 0,01$, FIG 6 B).

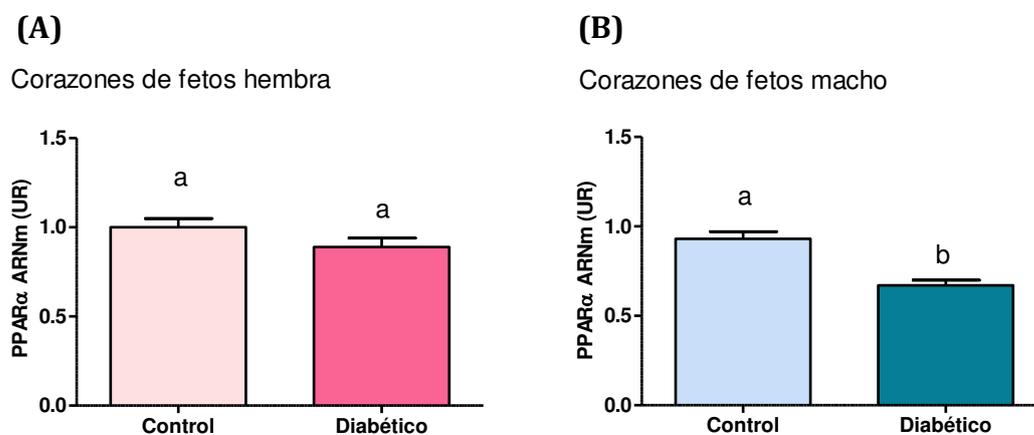


FIGURA 6. Expresión génica de PPAR α en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media \pm error estándar; $n=8$ corazones fetales provenientes de distintas ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: *t*- Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Al analizar la expresión génica de PPAR γ , en forma similar a lo observado con la expresión génica de PPAR α , no se encontraron diferencias en los corazones

de fetos hembra entre el grupo control y el grupo diabético (FIG 7 A). En cambio, en los corazones de fetos macho, el grupo diabético presentó menores niveles de ARN mensajero del receptor PPAR γ respecto al grupo control ($p < 0,05$, FIG 7 B).

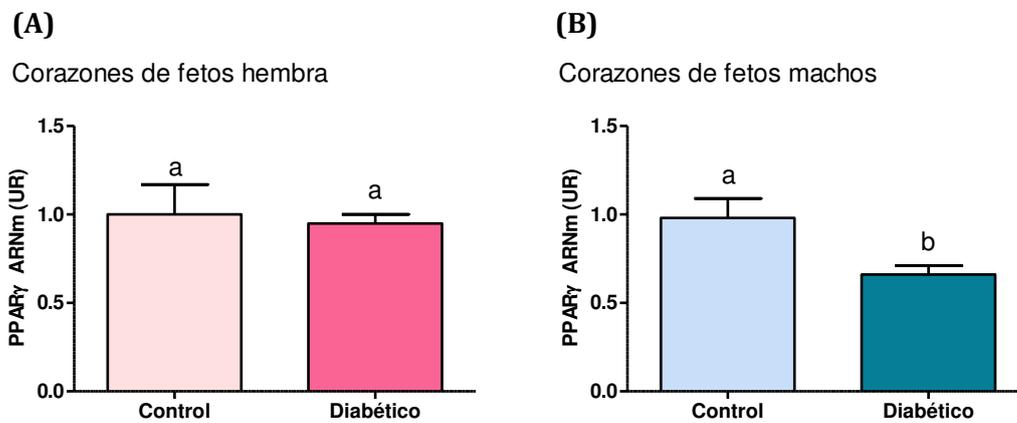


FIGURA 7. Expresión génica de PPAR γ en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media \pm error estándar; $n=8$ corazones fetales provenientes de distintas ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: *t*-Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

CAPÍTULO III

Efecto del tratamiento in vivo con LTB₄, agonista de PPAR α , en corazones de fetos de rata diabética en la gestación a término.



Habiendo evidenciado alteraciones en los niveles de ARN mensajero de los receptores PPAR y al mismo tiempo anomalías en el metabolismo lipídico, alterada producción de NO y de lipoperóxidos en el corazón de fetos de ratas diabéticas, fue de interés evaluar el efecto del agonista endógeno del receptor PPAR α , LTB₄ sobre dichas anomalías inducidas por la diabetes.

PPAR α , se expresa en órganos metabólicamente activos, entre los que se encuentra el corazón (Lefebvre y col. 2006) y su expresión ya se registra desde la etapa fetal (Abbott 2009). Este receptor cumple múltiples funciones relacionadas con la homeostasis lipídica y el control de procesos inflamatorios en el corazón adulto (Lee y Kim 2015) y alteraciones en su expresión y/o en la vía de señalización están vinculadas con el desarrollo de diversas patologías (Finck 2007)

Estudios de nuestro laboratorio realizados en un modelo de diabetes experimental en la rata evidenciaron que la activación de PPAR α es capaz de regular parámetros alterados por la diabetes materna en placentas, así como también en el hígado fetal (Martinez y col. 2011a, Martinez y col. 2011b). El LTB₄, es un eicosanoide producto de la metabolización del ácido araquidónico que es capaz de activar PPAR α (Lin y col. 1999, Hihi y col. 2002). A través del abordaje *in vivo* de las inyecciones intrafetales con LTB₄, hemos evaluado el rol del receptor PPAR α como regulador de las alteraciones en el corazón fetal inducidas por la diabetes materna.

Efecto del tratamiento in vivo con LTB₄ sobre parámetros plasmáticos y peso fetal y peso del corazón de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en la gestación a término.

Para comenzar a analizar los efectos del agonista de PPAR α , LTB₄, sobre el feto a término, se evaluó la acción de este agonista sobre determinados parámetros metabólicos en plasma fetal, el peso fetal y de diversos órganos fetales. La administración de LTB₄ se llevó a cabo de forma intrafetal, por inyecciones de LTB₄ (0.1 μ moles) o vehículo en forma subcutánea a los fetos en los días 19, 20 y 21 de gestación, tal como se detalló en la sección de materiales y métodos. En el día 21 de gestación y luego de 3 horas de la última inyección, los fetos fueron explantados, sexados y se determinó el peso fetal y el peso de diversos órganos fetales, se preservaron los órganos fetales y se obtuvo el plasma fetal en el cual se determinó la glucemia y trigliceridemia.

El tratamiento *in vivo* con LTB₄ no modificó parámetros plasmáticos como la glucemia y la trigliceridemia en los fetos hembra y macho del grupo control ni del grupo diabético (TABLA 5, A y B).

Al analizar el peso fetal de hembras y machos, no se observaron diferencias entre los fetos tratados con LTB₄ y vehículo tanto en el grupo diabético como en el grupo control (TABLA 5, A y B).

El tratamiento *in vivo* con LTB₄ redujo el peso de los corazones de fetos hembra y macho respecto a los fetos del mismo sexo inyectados con vehículo en el grupo control y en el grupo diabético ($p < 0,05$, TABLA 5, A y B).

(A)Fetos hembra	Control		Diabético	
	Vehículo	LTB₄	Vehículo	LTB₄
Glucemia (mg/dl)	48 \pm 11 ^a	40 \pm 10 ^a	138 \pm 13 ^b	122 \pm 13 ^b
Trigliceridemia (g/l)	0,56 \pm 0,01 ^a	0,61 \pm 0,06 ^a	0,91 \pm 0,08 ^b	0,89 \pm 0,03 ^b
Peso fetal (g)	2,9 \pm 0,1 ^a	3,0 \pm 0,1 ^a	3,3 \pm 0,1 ^b	3,1 \pm 0,1 ^{ab}
Peso corazón fetal (mg)	24,2 \pm 0,4 ^a	21,7 \pm 0,6 ^b	26,9 \pm 0,4 ^c	23,7 \pm 0,8 ^a

(B) Fetos macho	Control		Diabético	
	Vehículo	LTB₄	Vehículo	LTB₄
Glucemia (mg/dl)	56±12 ^a	55±10 ^a	153±6 ^b	145±4 ^b
Trigliceridemia (g/l)	0,52±0,09 ^a	0,62±0,06 ^a	0,82±0,07 ^b	0,85±0,03 ^b
Peso fetal (g)	3,0± 0,1 ^a	3,3±0,2 ^{ab}	3,8±0,1 ^b	3,3±0,1 ^{ab}
Peso corazón fetal (mg)	26,0±0,4 ^a	23,3±0,6 ^b	28,6±0,6 ^c	25,1±0,7 ^{ab}

TABLA 5. Parámetros plasmáticos y pesos fetales y del corazón de fetos hembra (A) y machos (B) inyectados en los días 19, 20 y 21 de gestación con LTB₄. Se evaluó el conjunto de plasmas de todos los fetos hembra o todos los fetos macho de cada rata (n=12 ratas en cada grupo experimental). Los valores representan la media ± error estándar. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, p< 0,05.

Efecto del tratamiento in vivo con LTB₄ sobre la expresión génica de PPAR α en corazones de fetos hembra y macho en la gestación a término.

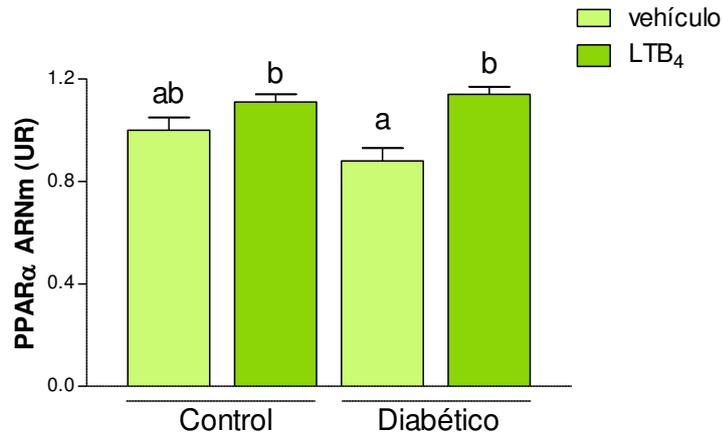
Dadas las alteraciones encontradas en los niveles de ARN mensajero de PPAR α en corazones de fetos de ratas diabéticas fue de particular interés evaluar el efecto del tratamiento con LTB₄, administrado al feto durante los últimos días de la gestación, sobre la expresión génica del receptor PPAR α . Se evaluaron entonces los niveles de ARN mensajero de PPAR α mediante RT-PCR, en corazones de fetos hembra y macho en el día 21 de gestación luego de 3 horas de haber recibido la última inyección de LTB₄, según el esquema de administración de este agonista antes detallado.

En los corazones de fetos hembra se observó que el tratamiento intrafetal con LTB₄ incrementó la expresión génica del receptor PPAR α en el grupo diabético ($p < 0,05$) respecto del corazón fetal del mismo grupo inyectado con vehículo (FIG 8 A).

En los corazones de feto macho, el tratamiento fetal con LTB₄, fue capaz de incrementar la expresión génica de PPAR α tanto en el grupo control como en el grupo diabético ($p < 0,05$, FIG 8 B).

(A)

Corazones de fetos hembra



(B)

Corazones de fetos macho

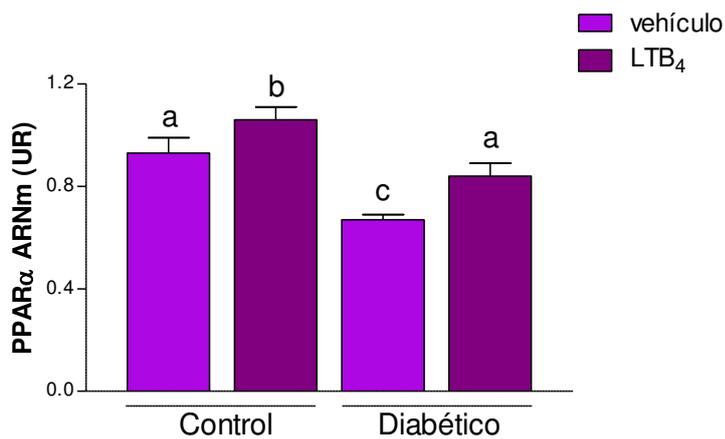


FIGURA 8. Expresión génica de PPAR α en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas, tratados *in vivo* los días 19, 20 y 21 con LTB₄. Los valores representan la media \pm error estándar; n=8 corazones fetales provenientes de distintas ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Efecto del tratamiento in vivo con LTB₄ sobre la expresión génica de ACO y CPT1 en corazones de fetos hembra y macho en la gestación a término.

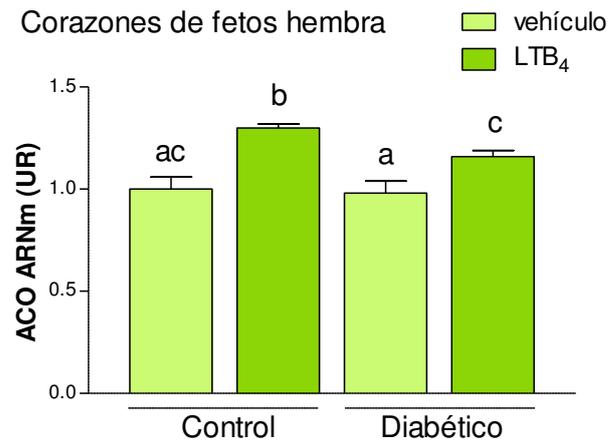
Entre las funciones del receptor PPAR α , son de relevancia aquellas involucradas en la oxidación de lípidos, dada la importancia de estos sustratos metabólicos para el corazón. PPAR α regula en diversos tejidos la expresión génica de transportadores de ácidos grasos y enzimas que participan en la oxidación de lípidos. Como se observó anteriormente, los niveles de ARN mensajero de enzimas como ACO y CPT1 están alterados en corazones fetales en la gestación diabética.

Con el fin de evaluar el efecto del agonista LTB₄ sobre la expresión de genes blanco del receptor PPAR α involucrados en el metabolismo oxidativo de lípidos, se analizó la expresión génica de ACO y CPT1 mediante RT-PCR, en corazones de fetos hembra y macho inyectados con LTB₄ (0,1 nmoles) o vehículo en los días 19, 20 y 21 de gestación, en grupos de ratas sanas y diabéticas, tal como se detalló en materiales y métodos.

En los corazones de fetos hembra, la administración de LTB₄ incrementó la expresión génica de ACO tanto en el grupo control como en el grupo diabético, en comparación con corazones de fetos inyectados con vehículo de los respectivos grupos ($p < 0,01$, FIG 9 A).

En los corazones de fetos macho, el tratamiento *in vivo* con LTB₄ no modificó los niveles de ARN mensajero de ACO en grupo control respecto a los corazones de fetos inyectados con vehículo del mismo grupo. En cambio, en el grupo diabético la inyección intrafetal con LTB₄ fue capaz de incrementar la expresión génica de ACO en los corazones fetales ($p < 0,001$, FIG 9 B), expresión que se encontraba disminuida por el estado diabético materno tal como se detalló anteriormente.

(A)



(B)

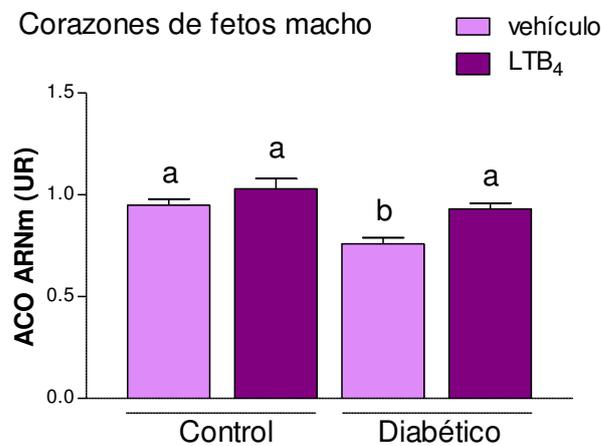


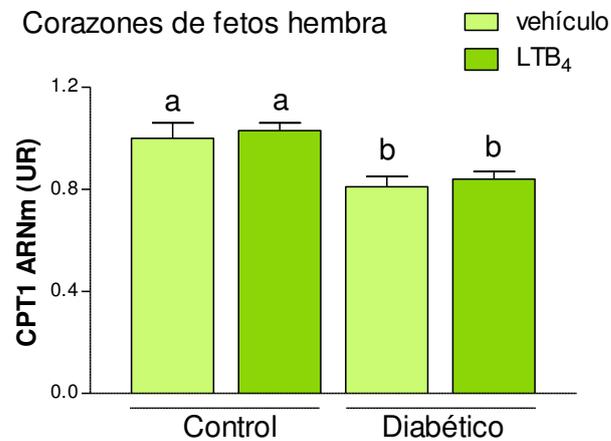
FIGURA 9. Expresión génica de ACO en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas, tratados *in vivo* los días 19, 20 y 21 de gestación con LTB₄ o vehículo. Los valores representan la media \pm error estándar; $n=8$ corazones fetales provenientes de distintas ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Al analizar la expresión génica de CPT1 se encontró que la administración intrafetal de LTB₄ no modificó los niveles de ARN mensajero de esta enzima en corazones de fetos hembra de rata control ni de rata diabética (FIG 10 A).

En los corazones de fetos macho del grupo control, se observó que el tratamiento *in vivo* con LTB₄ no produjo cambios en la expresión génica de CPT1 respecto a los corazones de fetos inyectados con vehículo. En el grupo diabético, en cambio, la administración de este agonista de PPAR α incrementó los reducidos

niveles de ARN mensajero de CPT1 encontrados en los corazones fetales de este grupo ($p < 0,01$, FIG 10 B).

(A)



(B)

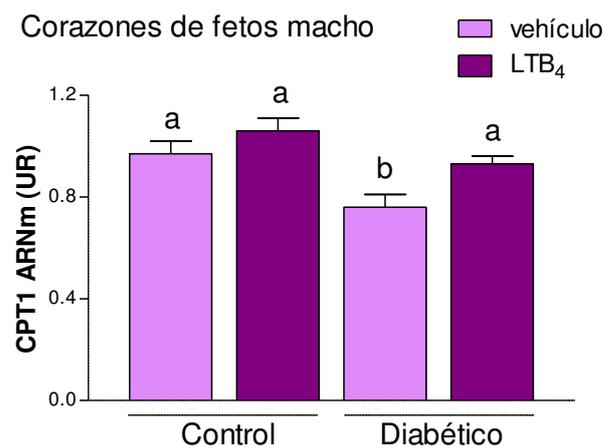


FIGURA 10. Expresión génica de CPT1 en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas, tratados in vivo los días 19, 20 y 21 de gestación con LTB₄ o vehículo. Los valores representan la media \pm error estándar; $n=8$ corazones fetales provenientes de distintas ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

CAPÍTULO IV

Efecto de dietas maternas enriquecidas en ácidos grasos agonistas de PPAR en corazones de fetos de rata diabética en la gestación a término.



*"Que tu alimento sea tu medicina
y que tu medicina sea tu alimento"*
Hipócrates

Los PPAR son receptores que presentan agonistas isotipo específicos, y a la vez poseen ligandos que tienen la capacidad de activar a los tres isotipos de PPAR, como ciertos ácidos grasos mono y poliinsaturados (Bordoni y col. 2006).

En la gestación, los ácidos grasos esenciales, poliinsaturados, deben ser aportados por la madre a través del transporte placentario, en la medida necesaria para suplir los requerimientos fetales (Gil-Sanchez y col. 2012). A partir de estos ácidos grasos esenciales se formarán otros lípidos bioactivos que tendrán una importante función como componentes de membranas, precursores de eicosanoides y ligandos de receptores nucleares. Su deficiencia está vinculada con alteraciones en el desarrollo (Innis 2007). Cabe mencionar en este contexto que en la gestación diabética se han encontrado anómalos niveles de PUFAS tanto en suero materno como fetal y que la diabetes materna induce profundas anomalías en el metabolismo lipídico (Higa y Jawerbaum 2013).

Fue de interés entonces evaluar el efecto de dietas maternas enriquecidas con ácidos grasos insaturados agonistas de PPAR sobre parámetros vinculados a la homeostasis lipídica y la producción de NO y lipoperóxidos, teniendo como antecedentes trabajos del laboratorio que muestran el efecto benéfico de estas dietas sobre el embrión y la placenta de ratas diabéticas (Capobianco y col. 2008a, Capobianco y col. 2008b, Higa y col. 2012).

Para llevar a cabo este estudio, a partir del día 1 de gestación, ratas sanas y diabéticas se separaron en 3 grupos experimentales. Estos grupos fueron alimentados con A) Dieta estándar: consiste en el alimento balanceado comercial, B) Dieta estándar suplementada con 6% de aceite de oliva, rico en ácido oleico (ácido graso monoinsaturado n-9) o C) Dieta estándar suplementada con 6% de aceite de cártamo, enriquecido en ácido linoleico (ácido graso poliinsaturado n-6).

Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre parámetros plasmáticos maternos y fetales y sobre el peso fetal y del corazón de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

En primer lugar se evaluó el efecto de dietas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo, ricos en ácidos grasos agonistas de PPAR, administradas durante toda la gestación sobre parámetros plasmáticos como la glucemia y trigliceridemia materna y fetal en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas. A su vez se analizó el peso fetal y de los corazones fetales en el día 21 de gestación bajo estos tratamientos dietarios administrados a las ratas gestantes.

Se observó que la administración de dietas suplementadas con aceite de oliva o aceite de cártamo no modificaron la glucemia, la trigliceridemia y la colesterolemia materna, tanto en el grupo control como en el grupo diabético (TABLA 6 A). Los tratamientos dietarios tampoco modificaron la glucemia y trigliceridemia fetal en el grupo control ni en el grupo diabético (TABLA 6 A y B)

El peso fetal no se modificó con los tratamientos dietarios en los fetos hembras de ratas sanas y diabéticas. En los fetos macho, los tratamientos dietarios no mostraron efectos sobre el grupo control, mientras que en el grupo diabético, la dieta suplementada con aceite de oliva redujo el peso fetal de ratas diabéticas ($p < 0,05$), sin observarse modificaciones con el tratamiento dietario con aceite de cártamo (TABLA 6 C)

Al analizar el peso de los corazones fetales, se observó que los tratamientos dietarios no modificaron el peso de los corazones de los fetos macho y hembra en el grupo control ni en el grupo diabético (TABLA 6 B y C).

(A) Datos maternos	Control			Diabético			
	Dieta	Estándar	Oliva	Cártamo	Estándar	Oliva	Cártamo
Glucemia (mg/dl)		99±14 ^a	115±7 ^a	116±13 ^a	217±24 ^b	236±27 ^b	231±19 ^b
Trigliceridemia (g/l)		2,04±0,21 ^a	2,06±0,30 ^a	1,97±0,19 ^a	4,22±0,50 ^b	3,65±0,20 ^b	3,50±0,40 ^b
Colesterolemia (g/l)		1,14±0,09 ^a	1,35±0,06 ^{ab}	1,30±0,06 ^{ab}	1,75±0,12 ^c	1,50±0,09 ^{bc}	1,61±0,19 ^{bc}

(B) Fetus hembra	Control			Diabético			
	Dieta	Estándar	Oliva	Cártamo	Estándar	Oliva	Cártamo
Glucemia (mg/dl)		42±10 ^a	48±14 ^a	47±8 ^a	141±20 ^b	127±20 ^b	114±30 ^b
Trigliceridemia (g/l)		0,50±0,04 ^a	0,60±0,03 ^a	0,44±0,05 ^a	1,02±0,12 ^b	1,17±0,12 ^b	0,92±0,07 ^b
Peso fetal (g)		3,03±0,04 ^a	3,10±0,04 ^a	3,02±0,04 ^a	3,40±0,06 ^b	3,24±0,05 ^{ab}	3,40±0,08 ^b
Peso corazón fetal (mg)		24,06±0,4 ^a	24,9±0,6 ^a	23,8±0,6 ^a	26,6±0,5 ^b	26,6±0,6 ^b	25,3±0,7 ^{ab}

(C) Fetus macho	Control			Diabético			
	Dieta	Estándar	Oliva	Cártamo	Estándar	Oliva	Cártamo
Glucemia (mg/dl)		41±16 ^a	48±8 ^a	51±12 ^a	143±21 ^b	165±31 ^b	132±29 ^b
Trigliceridemia (g/l)		0,52±0,06 ^a	0,61±0,06 ^a	0,77±0,09 ^a	0,99±0,09 ^b	1,19±0,12 ^b	1,18±0,14 ^b
Peso fetal (g)		3,13±0,04 ^a	3,31±0,07 ^a	3,33±0,07 ^a	3,54±0,06 ^b	3,30±0,05 ^a	3,46±0,09 ^b
Peso corazón fetal (mg)		25,5±0,5 ^a	26,4±0,7 ^{ab}	24,9±0,8 ^a	27,8±0,4 ^b	26,8±0,7 ^{ab}	25,5±0,7 ^{ab}

TABLA 6. Efecto de tratamientos dietarios durante toda la gestación con suplemento de aceite de oliva o cártamo sobre parámetros plasmáticos de ratas sanas y diabéticas (A) y parámetros plasmáticos, pesos fetales y del corazón de fetos hembra (B) y macho (C) en el día 21 de gestación. Se evaluó el conjunto de plasmas de todos los fetos hembra o todos los fetos macho de cada rata. n=12 ratas en cada grupo experimental. Los valores representan la media ± error estándar. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, p < 0,05.

Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la concentración de lípidos en corazones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas.

Se evaluó la concentración de diversas especies lipídicas en corazones de fetos hembra y macho de ratas sanas o diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta estándar, dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o dieta suplementada con 6% de aceite de cártamo. La medición se realizó a través de la extracción de lípidos totales de corazones fetales y posterior separación por TLC.

En los corazones de fetos hembra se observó que el tratamiento dietario en la rata gestante con aceite de oliva incrementó los niveles de triglicéridos en el grupo diabético ($p < 0,01$, FIG 11). En el grupo control, la suplementación dietaria con aceite de oliva redujo los niveles de colesterol en los corazones fetales ($p < 0,01$) y la suplementación dietaria con aceite de cártamo incrementó los niveles de ésteres de colesterol ($p < 0,05$, FIG 11).

Corazones de fetos hembra

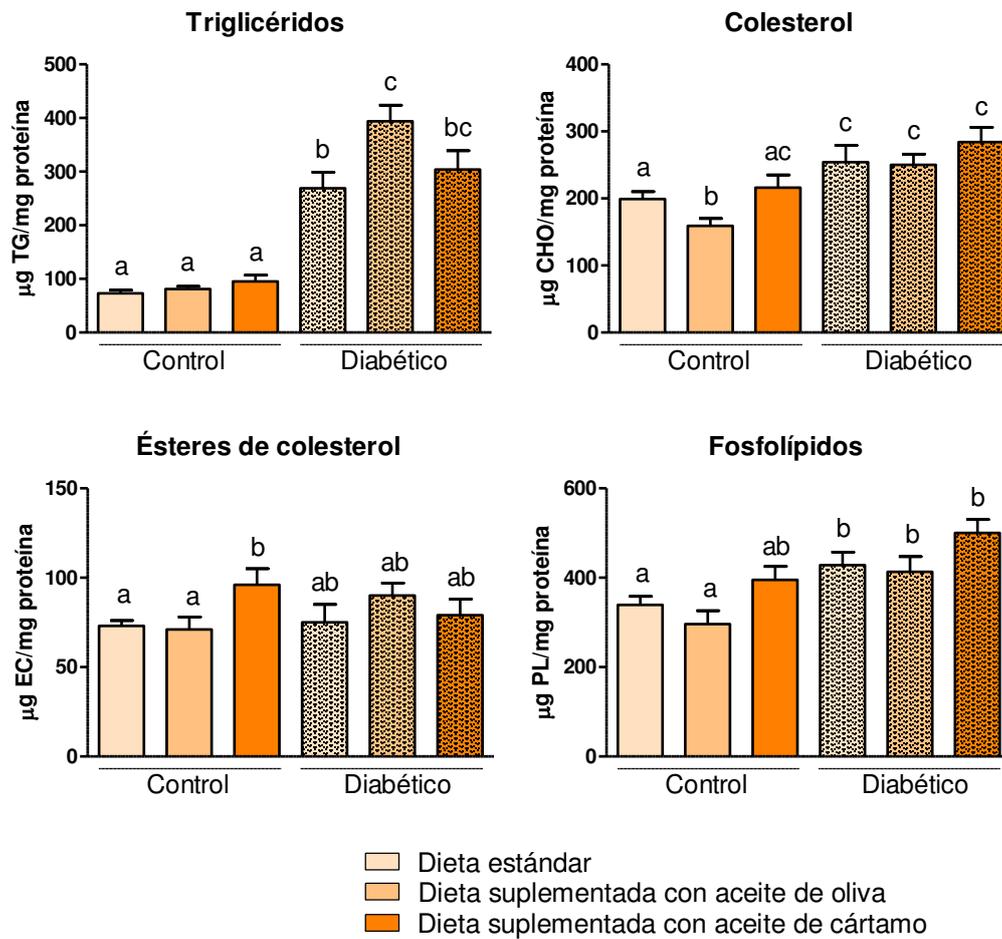


FIGURA 11. Concentraciones de lípidos en corazones de fetos hembra de ratas sanas y diabéticas tratadas con alimento suplementado con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo durante toda la gestación. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Al analizar el efecto de las dietas maternas sobre las concentraciones de lípidos en los corazones de fetos macho se encontró que dichos tratamientos no modificaron los niveles de ninguna de la especies lipídicas evaluadas (FIG 12).

Corazones de fetos macho

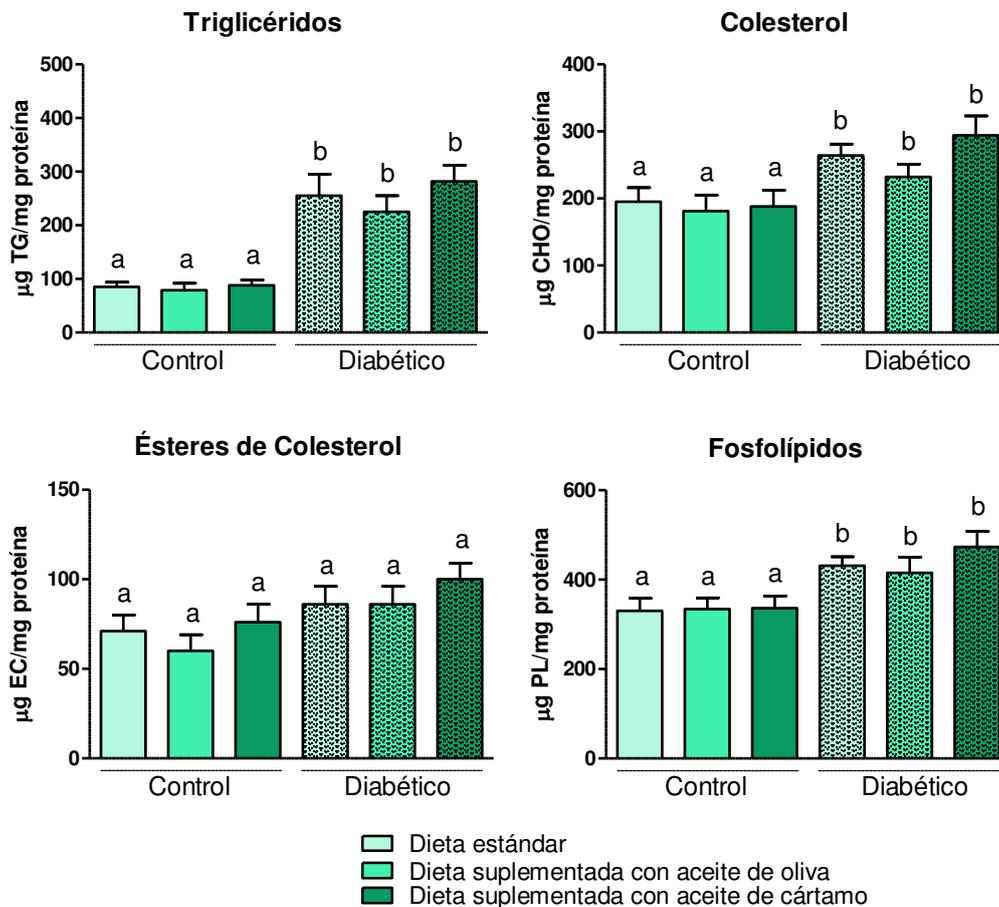


FIGURA 12. Concentraciones de lípidos en corazones de fetos macho de ratas sanas y diabéticas tratadas con alimento suplementado con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo durante toda la gestación. Los valores representan la media \pm error estándar, $n = 8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la expresión génica de PPAR α y PPAR γ en corazones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas.

A continuación se analizó el efecto de las dietas enriquecidas con ácidos grasos agonistas de PPAR administradas a la rata durante toda la gestación sobre la expresión génica de las isoformas PPAR α y PPAR γ en corazones fetales en el día 21 de gestación. Este análisis se llevó a cabo mediante la técnica de RT-PCR.

Al evaluar los niveles de ARN mensajero de PPAR α , se observó que en los corazones de fetos hembra, el tratamiento dietario con aceite de cártamo no

modificó la expresión génica de este receptor en el grupo control ni en el grupo diabético. El tratamiento dietario con aceite de oliva a la rata gestante disminuyó la expresión génica de PPAR α en los corazones fetales del grupo diabético, respecto a lo observado en los corazones fetales de ratas alimentadas con dieta estándar del mismo grupo ($p < 0,05$, FIG 13 A).

En los corazones de fetos macho, ambos tratamientos dietarios incrementaron los niveles de ARN mensajero de PPAR α tanto en el grupo control ($p < 0,01$ dieta con oliva, $p < 0,05$ dieta con cártamo) como en el grupo diabético ($p < 0,05$) en comparación con lo observado en los corazones de fetos de ratas alimentadas con dieta estándar de los respectivos grupos (FIG 13 B).

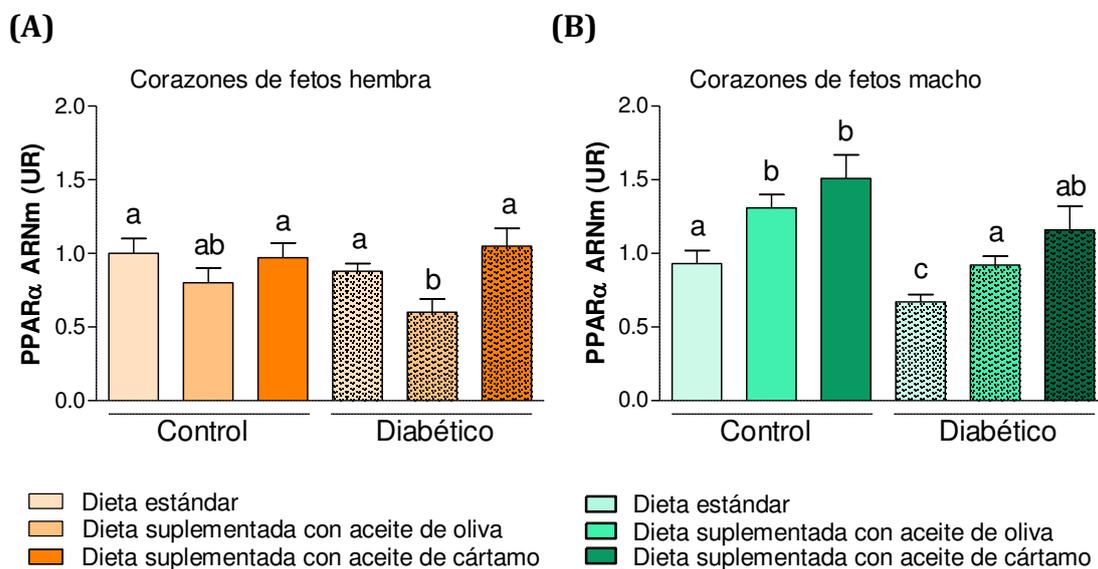


FIGURA 13. Expresión génica de PPAR α en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo. Los valores representan la media \pm error estándar; $n=8$ corazones fetales provenientes de distintas ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Al analizar la expresión génica del receptor PPAR γ , se encontró que en los corazones de fetos hembra, las dietas suplementadas con aceite de oliva o con aceite de cártamo no modificaron los niveles de ARN mensajero de este receptor en el grupo de ratas control ni en el grupo de ratas diabéticas (FIG 14 A).

En los corazones de fetos macho, los tratamientos dietarios no mostraron efecto sobre la expresión génica de PPAR γ en el grupo control (FIG 14 B). En cambio, en los corazones de fetos de ratas del grupo diabético se evidenció un aumento en los niveles de ARN mensajero del receptor PPAR γ tanto el grupo que recibió alimento suplementado con aceite de oliva ($p < 0,01$) como el que recibió alimento suplementado con aceite de cártamo ($p < 0,001$) (FIG 14 B).

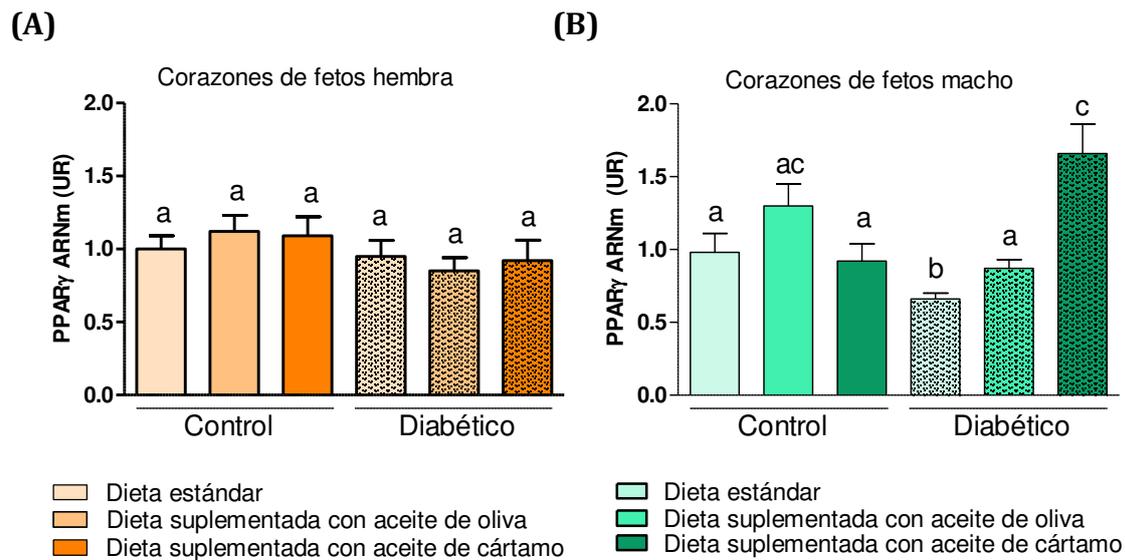


FIGURA 14. Expresión génica de PPAR γ en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo. Los valores representan la media \pm error estándar; $n=8$ corazones fetales provenientes de distintas ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la expresión génica de ACO y CPT1 en corazones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas.

Se evaluó en los corazones fetales los niveles de ARN mensajero de ACO y CPT1, enzimas involucradas en la oxidación de lípidos, dado que sus genes son blanco de la regulación por los receptores PPAR.

Al analizar la expresión génica de la ACO, se encontró que los tratamientos dietarios no modificaron los niveles de ARN mensajero de esta enzima en los corazones de fetos hembra y macho del grupo control ni del grupo diabético (FIG 15 A y B).

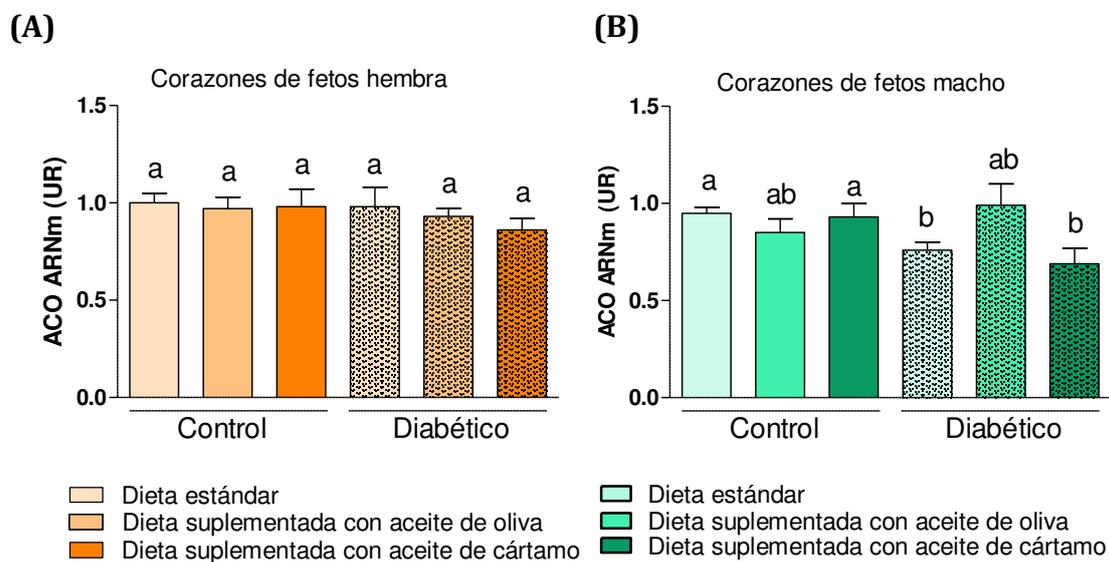


FIGURA 15. Expresión génica de ACO en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo. Los valores representan la media \pm error estándar; $n=8$ corazones fetales provenientes de distintas ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Cuando se analizó la expresión génica de la enzima CPT1, se observó que las suplementaciones dietarias con aceite de oliva o aceite de cártamo, no modificaron la reducida expresión génica de esta enzima encontrada en los corazones de fetos hembra y macho de rata diabética (FIG 16 A y B).

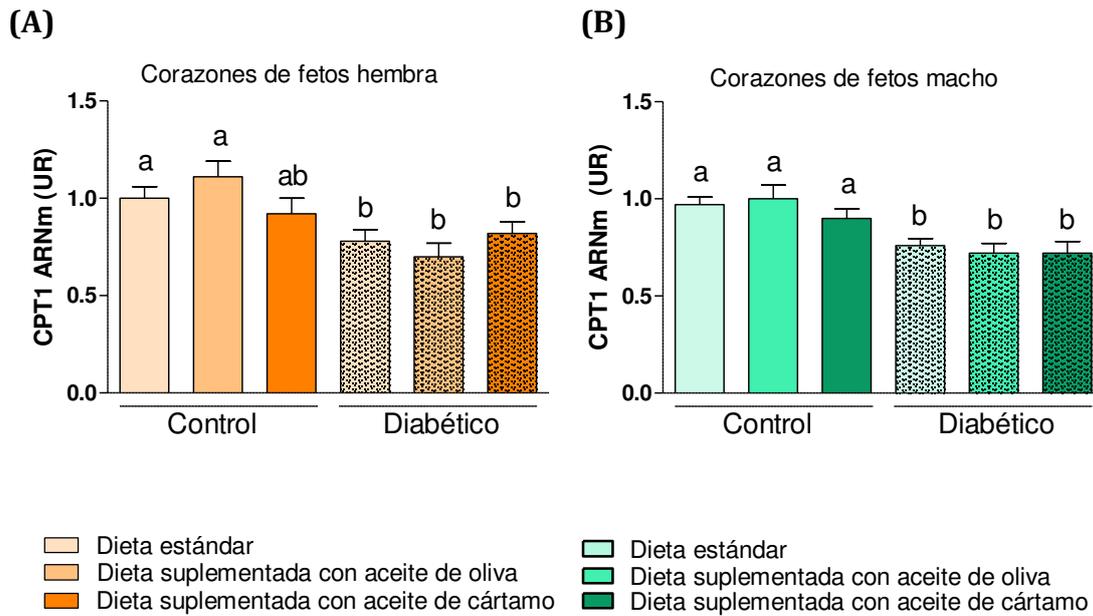


FIGURA 16. Expresión génica de CPT1 en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo. Los valores representan la media \pm error estándar; $n=8$ corazones fetales provenientes de distintas ratas en cada grupo experimental Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la producción de NO y lipoperóxidos en corazones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas.

Como se mostró anteriormente en este trabajo, en los corazones fetales de rata diabética se encontró una elevada producción de óxido nítrico y lipoperóxidos, indicadores de un estado pro-inflamatorio y pro-oxidante. Es por esto que resultó de interés evaluar si el tratamiento dietario a ratas gestantes con dietas ricas en ácidos grasos agonistas de PPAR, son capaces de regular la producción de NO y lipoperóxidos en corazones fetales a término.

Al evaluar la producción de NO a través del dosaje de sus metabolitos estables los nitratos-nitritos, por el método de Griess, se encontró que en los corazones de fetos hembra de rata diabética, el tratamiento dietario con aceite de cártamo fue capaz de reducir la incrementada producción de NO encontrada en los corazones de fetos del grupo diabético ($p < 0,01$, FIG 17).

La producción de NO, que se encontraba elevada en los corazones de fetos macho del grupo diabético, fue significativamente menor en los corazones de fetos macho de ratas diabéticas que fueron alimentadas con dietas suplementadas con aceite de oliva y con aceite de cártamo ($p < 0,001$, FIG 17)

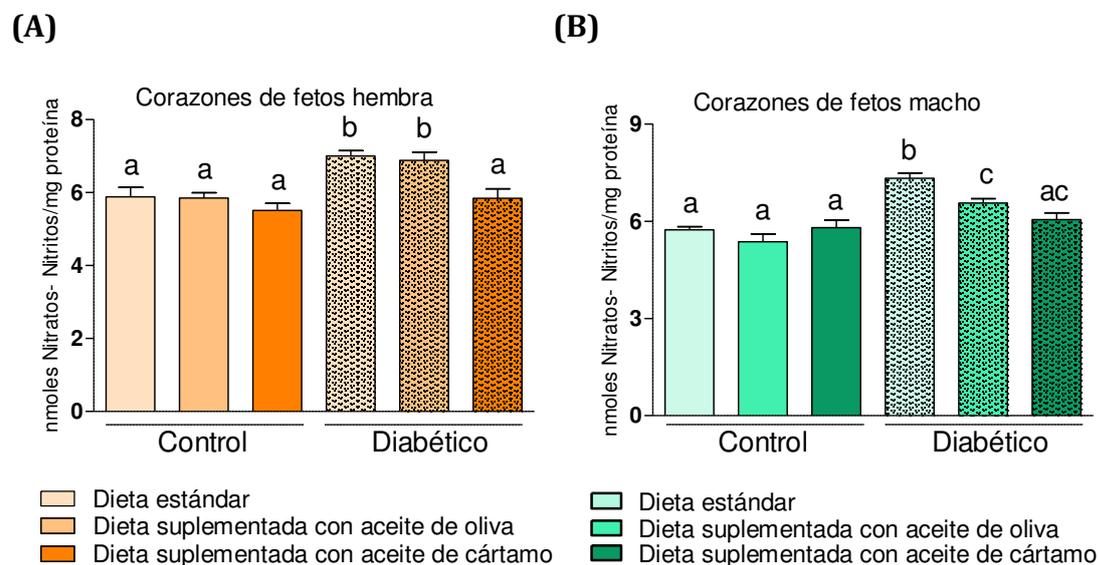


FIGURA 17. Producción de NO en corazones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo. Niveles de nitratos/nitritos, metabolitos estables del NO. Los valores representan la media \pm error

estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Al evaluar la peroxidación lipídica, mediante el dosaje de TBARS, se encontró que en los corazones de fetos hembra del grupo control y del grupo diabético, las dietas administradas no modificaron la producción de lipoperóxidos (FIG 18 A). En cambio, al observar el efecto de los tratamientos dietarios sobre la peroxidación lipídica en corazones de fetos macho, se encontró que la dieta suplementada con aceite de cártamo redujo los niveles de TBARS en el grupo diabético respecto a los niveles encontrados en los corazones de ratas alimentadas con dieta estándar del mismo grupo ($p < 0,01$, FIG 18 B).

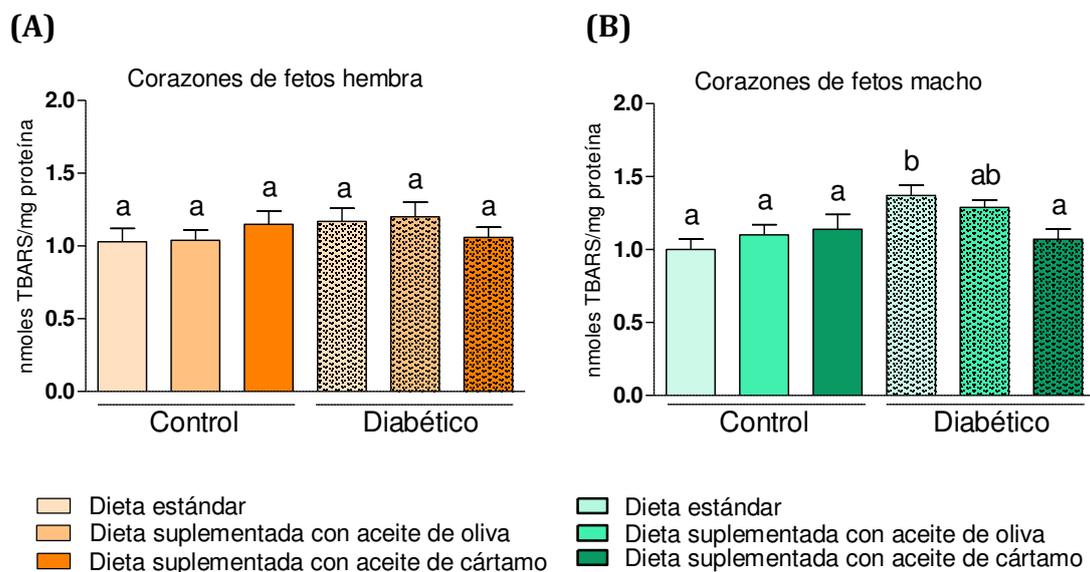


FIGURA 18. Niveles de lipoperóxidos de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo. Dosaje de TBARS en corazones de fetales. Los valores representan la media \pm error estándar; $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

CAPÍTULO V

Alteraciones en pulmones de fetos de rata diabética en la gestación a término.



Diversos estudios han demostrado alteraciones fisiológicas y estructurales del pulmón inducidas por la patología diabética en pacientes adultos (Goldman 2003, Yang *col.* 2011). Además, en modelos animales de diabetes se ha identificado en el pulmón un estado pro-inflamatorio vinculado a la sobreproducción de NO (Oztay *y col.* 2008) y un desbalance oxidativo producto de la disminución en la actividad antioxidante y el incremento de lipoperóxidos (Gumieniczek *y col.* 2002)

La diabetes durante la gestación afecta al feto en múltiples aspectos y se asocia con mayores complicaciones respiratorias en el neonato, siendo el distres respiratorio fetal una de las principales causas de morbi-mortalidad neonatal asociadas a la patología diabética en la gestación (Robert *y col.* 1976). El pulmón fetal que se desarrolla en un entorno diabético, presenta alteraciones estructurales y en la producción de surfactante pulmonar, anomalías que se vinculan con el retraso de la maduración pulmonar (Trevino-Alanis *y col.* 2009, Koskinen *y col.* 2011, Lock *y col.* 2013).

Muchas de las alteraciones en el pulmón fetal asociadas a la gestación diabética no han sido del todo dilucidadas y son múltiples las vías que se encuentran afectadas por la diabetes materna. Resultó de interés entonces, evaluar el efecto de la diabetes materna sobre el metabolismo lipídico, la producción de NO y lipoperóxidos en el pulmón fetal en la gestación de ratas a término.

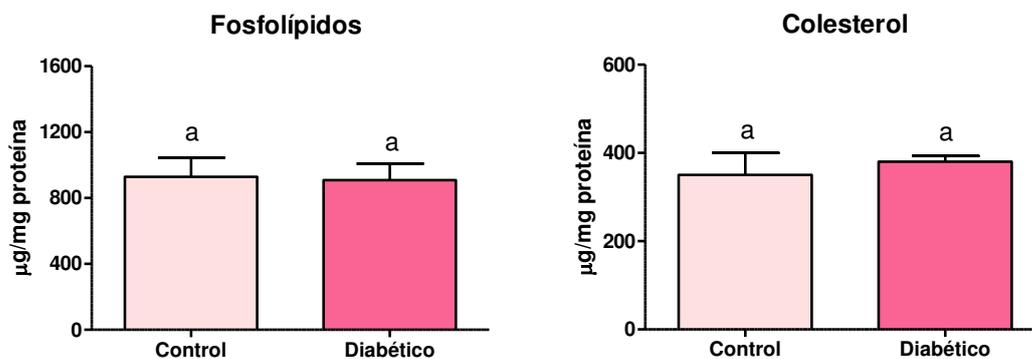
Concentración de especies lipídicas en pulmones de fetos macho y hembra de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

Trabajos de nuestro laboratorio evidenciaron que la diabetes materna induce la sobreacumulación de diversas especies lipídicas en distintos órganos, entre ellos la placenta y el hígado fetal (Capobianco *y col.* 2008, Martínez *y col.* 2011). En este estudio se analizó el contenido de diferentes especies lipídicas en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas mediante extracción y separación por cromatografía en capa delgada (TLC) y posterior cuantificación.

En los pulmones de fetos hembra de ratas diabéticas se observó un incremento en los niveles de triglicéridos respecto al grupo control ($p < 0,01$), mientras que no se encontraron diferencias en los niveles de fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol entre los pulmones de los fetos de ratas sanas y diabéticas (FIG 19 A).

En los pulmones de fetos macho de ratas diabéticas se observó un incremento de las concentraciones de fosfolípidos ($p < 0,05$) y de triglicéridos ($p < 0,001$) respecto del grupo de ratas sanas. No se observaron diferencias en los niveles de colesterol y ésteres de colesterol en los pulmones de los fetos de ratas sanas y diabéticas (FIG 19 B).

(A) Pulmones de fetos hembra



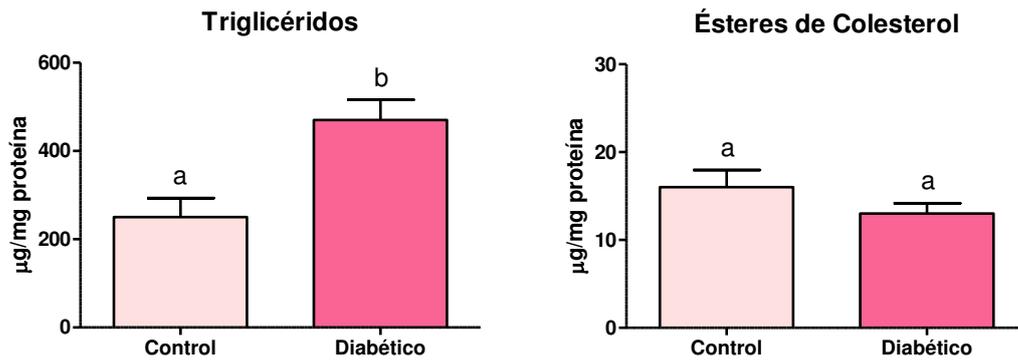
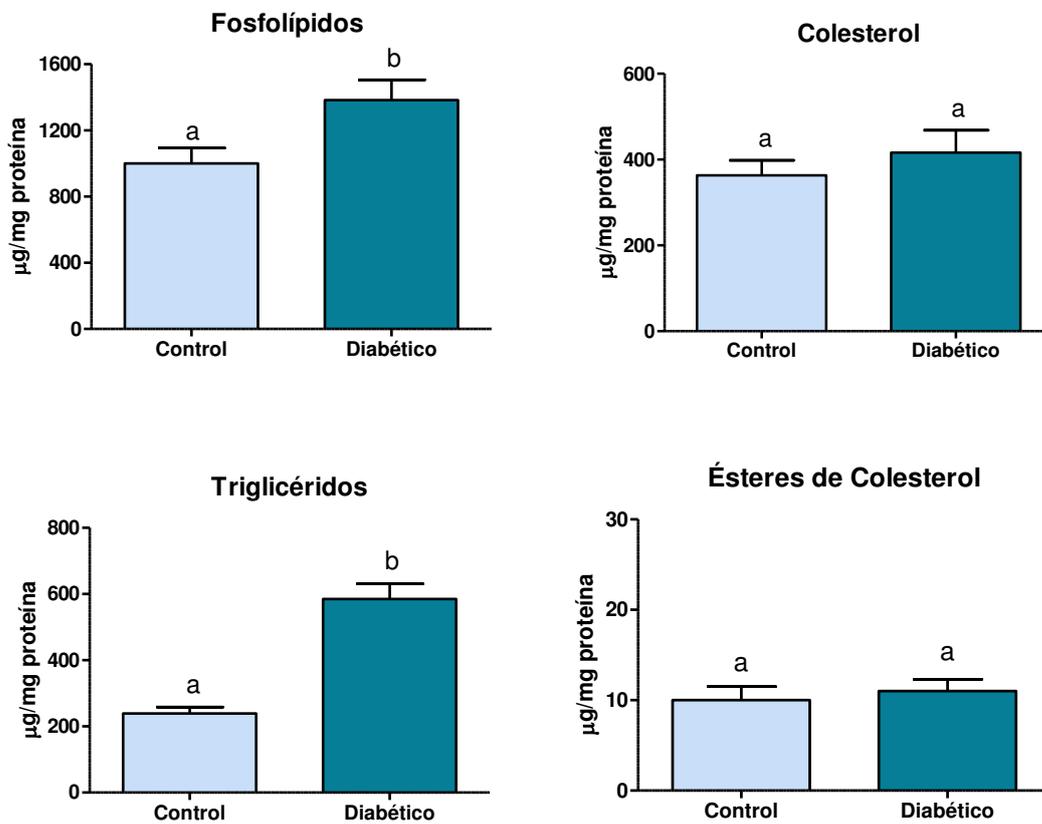
**(B) Pulmones de fetos macho**

FIGURA 19. Concentraciones de lípidos en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media \pm error estándar; $n=8$ pulmones fetales provenientes de distintas ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: *t*-Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Composición de ácidos grasos en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

Dadas las diferencias encontradas en los niveles de lípidos en los pulmones de fetos de rata diabética, resultó de interés evaluar la composición porcentual de ácidos grasos en pulmones fetales de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación, dada la importancia de dicha composición en la función de las membranas y los procesos de señalización celular.

Este análisis se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía gaseosa (CG), en la Unidad de Microanálisis y Métodos Físicos aplicados a la Química Orgánica (UMYFOR- FCEyN, UBA- CONICET) en colaboración con las Dras. Marta Maier y Valeria Careaga.

Al comparar la composición porcentual de ácidos grasos en pulmones fetales, no se encontró diferencia entre los pulmones de fetos hembra y los pulmones de fetos macho, motivo por el cual se presentan los datos combinados de ambos sexos en la Tabla 7. Al evaluar la composición porcentual de ácidos grasos de los pulmones de fetos de ratas sanas y diabéticas sólo se observó una disminución de los niveles del ácido pentadecanoico en el grupo diabético respecto al grupo control ($p>0.01$, Tabla 7).

ÁCIDOS GRASOS (%)		Pulmones fetales	
		Control	Diabético
C14	Mirístico	1,94±0,24 ^a	2,06±0,21 ^a
C15	Pentadecanoico	1,23±0,28^a	0,40±0,04^b
C16	Palmítico	32,19±0,56 ^a	33,50±0,18 ^a
C17	Margárico	0,37±0,07 ^a	0,23±0,04 ^a
C18	Estearico	11,35±0,16 ^a	11,18±0,86 ^a
C20	Araquídico	0,36±0,03 ^a	0,39±0,03 ^a
C22	Behénico	1,73±0,05 ^a	1,63±0,20 ^a
C16:1 (n-7)	Palmitoleico	6,58±0,37 ^a	5,56±0,33 ^a
C18:1 (n-9)	Oleico	17,33±0,90 ^a	20,19±3,7 ^a
C20:1(n-9)	Gondoico	0,41±0,05 ^a	0,40±0,05 ^a
C22:1 (n-9)	Erúcido	0,62±0,07 ^a	0,69±0,08 ^a

C18:2 (n-6)	Linoleico	4,85±0,30 ^a	5,09±0,60 ^a
C20:2(n-3/6)	Ecosadienoico	0,56±0,04 ^a	0,53±0,06 ^a
C20:3 (n-6)	Dihomogamma linolénico	0,36±0,04 ^a	0,37±0,05 ^a
C20:4(n-6)	Araquidónico	10,30±0,33 ^a	10,49±0,29 ^a
C20:5(n-3/6)	Docosapentanoico	0,36±0,06 ^a	0,32±0,05 ^a
C22:6(n-3)	Docosahexaenoico	2,69±0,10 ^a	3,08±0,38 ^a

Tabla 7. Composición porcentual de ácidos grasos en pulmones de fetos de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media ± error estándar. n=6 ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: t- Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Expresión génica de enzimas involucradas en la oxidación de lípidos en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

Habiendo evidenciado alteraciones en las concentraciones de lípidos en el pulmón de fetos hembra y macho de ratas diabéticas, se analizaron los niveles de ARN mensajero de AcilCoA oxidasa (ACO) y de Carnitina palmitoil transferasa 1 (CPT1), ambas enzimas claves en la oxidación de lípidos, mediante la técnica de RT-PCR.

Tanto en los fetos hembra como en los fetos macho del grupo diabético, la expresión génica de ACO se encontró disminuida respecto al grupo control ($p < 0,05$, FIG 20 A y B).

Asímismo, la expresión génica de CPT1 se encontró disminuida en los fetos hembra y macho de ratas diabéticas comparadas con los niveles encontrados en los fetos de ratas sanas ($p < 0,001$, FIG 20 C y D).

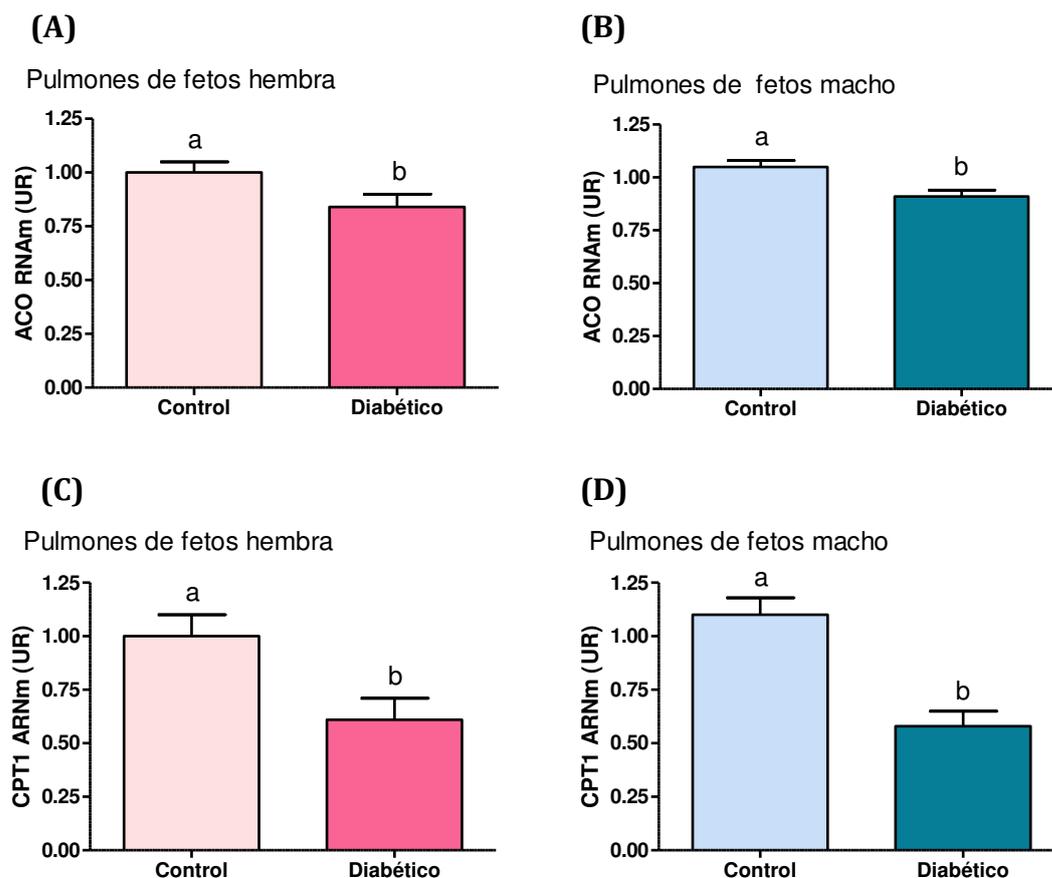


FIGURA 20. Expresión génica de AcilCoA Oxidasa y Carnitina palmitoil transferasa 1 en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas. Expresión génica de ACO

en pulmones de fetos hembra **(A)** y macho **(B)** de ratas sanas y diabéticas. Expresión génica de CPT1 en pulmones de fetos hembra **(C)** y macho **(D)** de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media \pm error estándar, n=8 ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: t- Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Producción de óxido nítrico y lipoperoxidación en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

La diabetes durante la gestación genera un estado pro-oxidante y pro-inflamatorio que se evidencia en distintos órganos fetales, el cual genera daño tisular a través de diversos mecanismos.

En este estudio se analizó la producción de óxido nítrico y la lipoperoxidación en el pulmón de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas.

Como índice de la producción de óxido nítrico se evaluaron los niveles de nitratos-nitritos, metabolitos estables resultantes de la oxidación del NO.

Tanto en los pulmones de fetos hembra como en los pulmones de los fetos macho se observó un incremento de la producción de NO en los pulmones fetales provenientes de ratas diabéticas, en comparación con los del grupo control (pulmones de fetos hembra $p < 0,01$, pulmones de fetos macho $p < 0,05$, FIG 21 A y B)

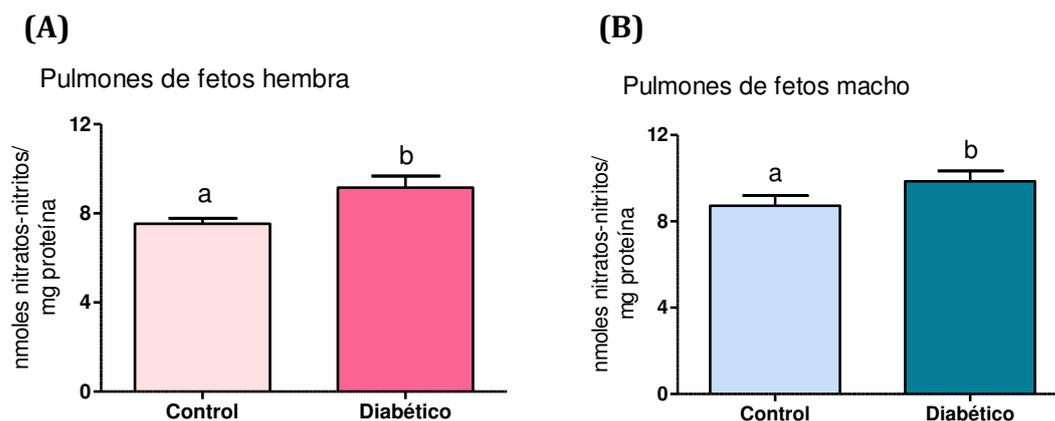


FIGURA 21. Producción de NO en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas. Niveles de nitratos/nitritos, metabolitos estables del NO en pulmones de fetos de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: *t*- Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Para evaluar el daño oxidativo a lípidos se midieron los niveles de TBARS, como indicador de los niveles de lipopeóxidos. Se observó que los pulmones de fetos macho y hembra del grupo diabético presentaron mayores índices de peroxidación lipídica respecto del grupo control (fetos hembra $p < 0,01$, fetos macho $p < 0,001$, FIG 22 A y B).

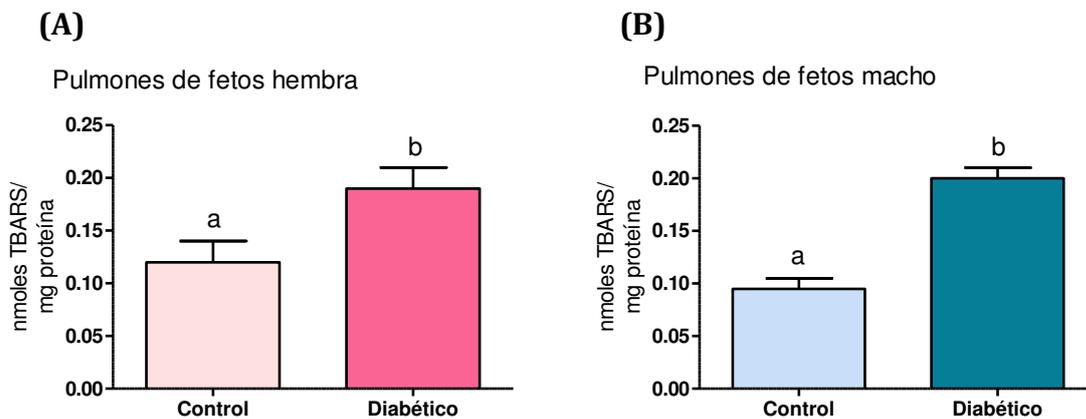


FIGURA 22. Producción de lipoperóxidos en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas. Niveles de TBARS en pulmones de fetos de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: *t*- Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Expresión génica de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

En este estudio se analizó los niveles de ARN mensajero de la iNOS en el pulmón de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas, mediante la técnica de RT-PCR.

Se observó que no hay diferencias en la expresión génica de iNOS en pulmones de fetos macho ni hembra del grupo diabético con respecto al grupo control (FIG 23 A y B).

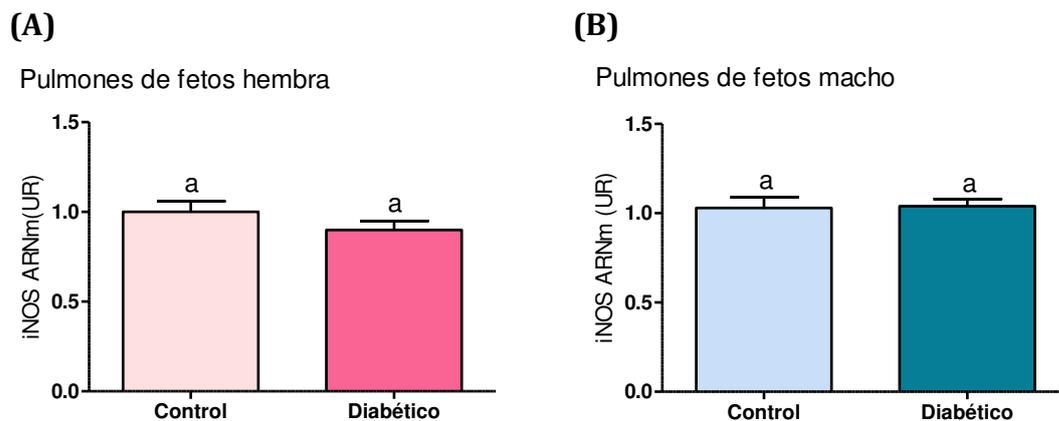


FIGURA 23. Expresión génica de iNOS en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: *t*- Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Expresión génica y niveles proteicos de PPAR α y PPAR γ en pulmones de fetos macho y hembra de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

Considerando las anomalías en el metabolismo lipídico y los parámetros vinculados al estrés oxidativo y nitrativo identificados en el pulmón fetal de rata diabética, resultó de interés la evaluación de la expresión de los PPAR. En efecto, estos receptores nucleares integran y regulan funciones vinculadas con la homeostasis lipídica y los procesos anti-oxidantes y anti-inflamatorios (Wahli y Michalik 2012). Se ha observado la expresión de PPAR α y PPAR γ en pulmones fetales tanto en humanos (Abbott *y col.* 2010) como en pulmones fetales de rata en la gestación a término (Chen *y col.* 1998).

En este estudio se analizaron los niveles proteicos y la expresión génica de PPAR α y PPAR γ en pulmones de fetos macho y hembra de ratas sanas y diabéticas.

Niveles de PPAR α y PPAR γ en pulmones de fetos macho y hembra de ratas sanas y diabéticas.

Se utilizó la técnica inmunohistoquímica para determinar los niveles proteicos de ambos receptores nucleares.

Los niveles de PPAR α en los pulmones de fetos hembra de ratas diabéticas fueron similares a los del grupo de ratas sanas, mientras que en los pulmones de fetos machos del grupo diabético los niveles de este receptor se encontraron disminuidos respecto al grupo de ratas sanas ($p < 0,05$, FIG 24)

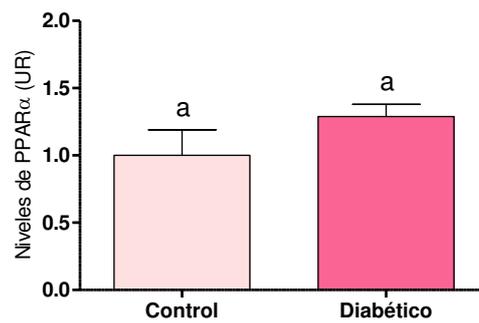
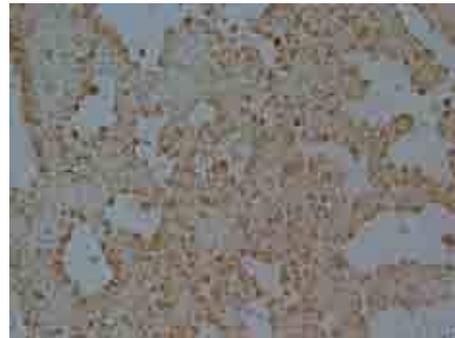
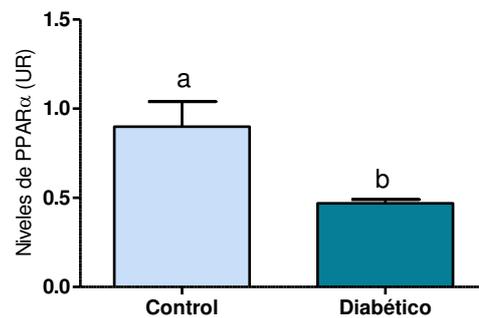
(A) Pulmones de fetos hembra*Control**Diabético***(B) Pulmones de fetos macho***Control**Diabético*

FIGURA 24. Niveles de PPAR α en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas. Fotomicrografía representativa (magnificación 400X). Inmunomarcación con anticuerpo específico anti PPAR α y análisis densitométrico de los niveles de PPAR α en pulmones fetales de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la

media \pm error estándar; $n=5$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: *t- Student*. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

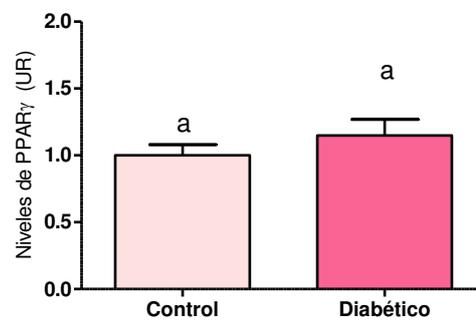
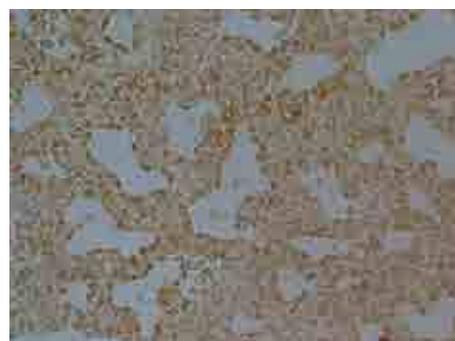
Los niveles de PPAR γ en los pulmones de fetos hembra fueron similares en el grupo de ratas sanas y el grupo de ratas diabéticas. En los pulmones de fetos macho del grupo de ratas diabéticas se observó una disminución de los niveles de PPAR γ respecto al grupo de ratas sanas ($p < 0,01$, FIG 25).

(A) Pulmones de fetos hembra

Control

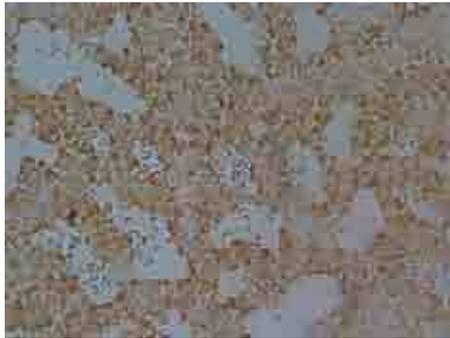


Diabético



(B) Pulmones de fetos macho

Control



Diabético

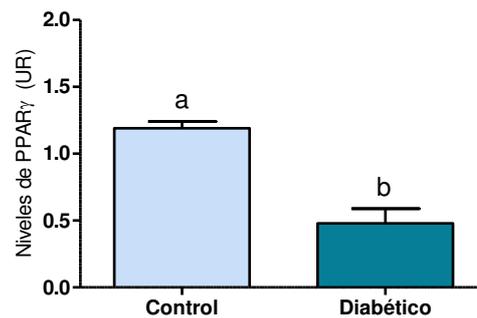


FIGURA 25. Niveles de PPAR γ en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas. Fotomicrografía representativa (magnificación 400X). Inmunomarcación con anticuerpo específico anti PPAR γ y análisis densitométrico de los niveles de PPAR γ en pulmones fetales de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=5$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: *t*- Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Expresión génica de PPAR α y PPAR γ en pulmones de fetos macho y hembra de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

Identificada la anómala expresión proteica de los receptores PPAR α y PPAR γ y alteraciones en el metabolismo lipídico en pulmones de fetos de rata diabética, fue de interés evaluar la expresión génica de los receptores PPAR α y PPAR γ por medio de RT-PCR semicuantitativa.

Se observó que no hay diferencias en la expresión génica de PPAR α en los pulmones de fetos hembra entre el grupo control y el grupo diabético (FIG 3A). En los pulmones de fetos macho de ratas diabéticas se encontraron disminuidos los niveles del ARN mensajero de PPAR α respecto a los pulmones de fetos de ratas sanas ($p < 0,05$, FIG 26 B).

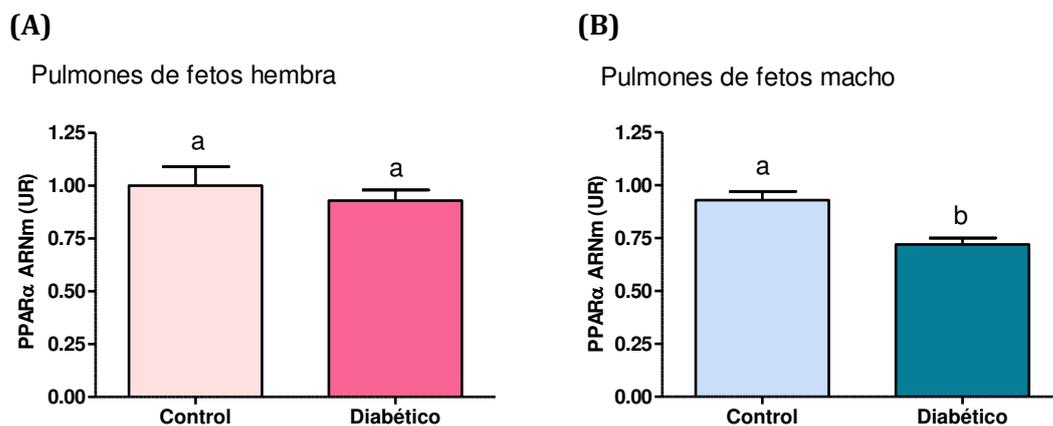


FIGURA 26. Expresión génica PPAR α en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: t - Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Al analizar la expresión génica de PPAR γ , se observó que fue similar en los pulmones de fetos hembra y macho del grupo diabético y control (FIG 27 A y B).

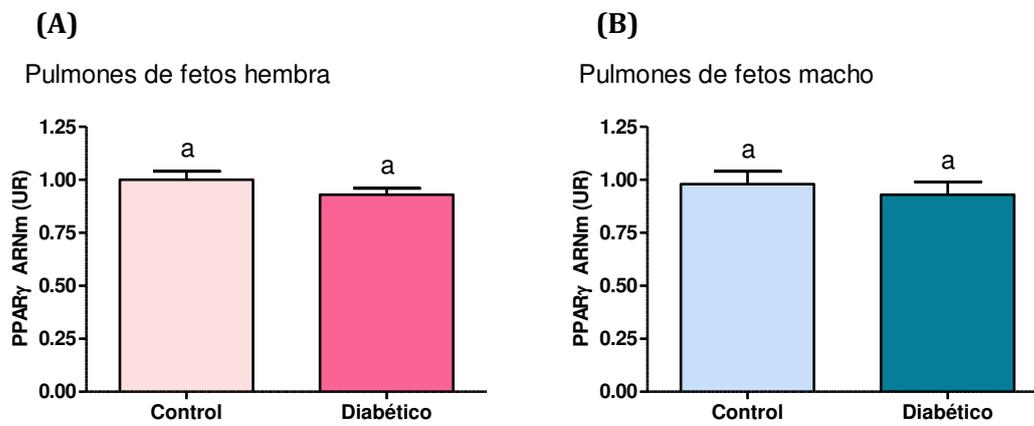


FIGURA 27. Expresión génica PPAR γ en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: t -Student. Las distintas letras (a-b) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

CAPÍTULO VI

Efecto del tratamiento in vivo con LTB₄, agonista de PPAR α en pulmones de fetos de rata diabética en la gestación a término.



Los resultados presentados en el capítulo anterior muestran profundas alteraciones en el pulmón fetal inducidas por la diabetes materna relacionadas con el metabolismo de los lípidos, la producción de NO y de lipoperóxidos. Además, los pulmones de fetos macho de ratas diabéticas presentan anómalos niveles de receptores PPAR. Numerosos trabajos describen el rol clave del receptor PPAR α en procesos del catabolismo lipídico y como regulador de la respuesta inflamatoria en diversos tejidos (Lefebvre y col. 2006, Bensinger y Tontonoz 2008), incluido el pulmón (Cuzzocrea 2006, Hecker y col. 2015). En la gestación, trabajos de nuestro laboratorio evidenciaron la capacidad de distintos agonistas de PPAR α de regular parámetros afectados por la diabetes materna en la placenta y el feto de rata (Martinez y col. 2008, Martinez y col. 2011). En este contexto, fue propósito de este trabajo evaluar los efectos de la activación del receptor PPAR α mediante la inyección intrafetal de LTB₄, agonista endógeno de este receptor. Las inyecciones intrafetales se llevaron a cabo los últimos tres días de la gestación en ratas sanas y diabéticas, tal como se detalló en la sección materiales y métodos. En el día 21 de gestación se evaluó la expresión de genes vinculados al metabolismo de los lípidos y la producción de NO.

Efecto del tratamiento in vivo con LTB₄ sobre el peso de pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término.

En el capítulo III se muestra que el tratamiento intrafetal con LTB₄ no tuvo efectos sobre parámetros plasmáticos como la glucemia y la trigliceridemia fetal. Tampoco se observaron cambios significativos en el peso fetal, en aquellos fetos que recibieron el agonista de PPAR α , LTB₄, respecto a los fetos del mismo grupo inyectados con vehículo.

Al analizar el peso del pulmón fetal se observó que tanto en los fetos hembra como en los macho, el peso de este órgano fue mayor en el grupo diabético respecto al control ($p < 0,001$, Tabla 8) y que el tratamiento intrafetal con LTB₄, redujo el peso del pulmón fetal de ratas diabéticas llevándolo a valores similares a los encontrados en el grupo control ($p < 0,01$, Tabla 8).

(A)Fetos hembra	Control		Diabético	
	Vehículo	LTB₄	Vehículo	LTB₄
Peso pulmón fetal (mg)	89±2 ^a	88±2 ^a	99±1 ^b	86±1 ^a

(B)Fetos macho	Control		Diabético	
	Vehículo	LTB₄	Vehículo	LTB₄
Peso pulmón fetal (mg)	99±1 ^a	103±1 ^a	110±2 ^b	95±3 ^a

TABLA 8. Peso del pulmón de fetos hembra (A) y macho (B) inyectados en los días 19, 20 y 21 de gestación, con LTB₄. Los valores representan la media \pm error estándar; n= 12 ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Efecto del tratamiento in vivo con LTB₄ sobre la expresión génica de PPAR α en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término.

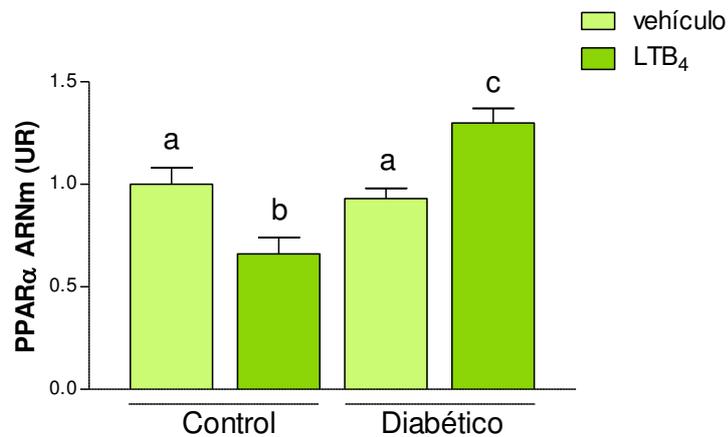
En el presente estudio se analizó la capacidad del agonista endógeno de PPAR α , LTB₄, administrado de forma intrafetal en los días 19, 20 y 21 de gestación, de regular la expresión génica de su propio receptor en pulmones fetales de rata. Dicha expresión se analizó en el día 21 de gestación.

En los pulmones de fetos hembra se observó que el tratamiento intrafetal con LTB₄ disminuyó los niveles de ARN mensajero del receptor PPAR α en el grupo control, respecto de los pulmones fetales del mismo grupo inyectado con vehículo. En el grupo diabético este tratamiento *in vivo* con LTB₄ aumentó la expresión génica de PPAR α respecto a los pulmones fetales del mismo grupo inyectados con vehículo (FIG 28, A).

En los pulmones de fetos macho, no se observó efecto del agonista LTB₄ sobre la expresión génica de PPAR α ni en el grupo control ni en el grupo diabético, en comparación con los fetos inyectados con vehículo de los respectivos grupos (FIG 28 B).

(A)

Pulmones de fetos hembra

**(B)**

Pulmones de fetos macho

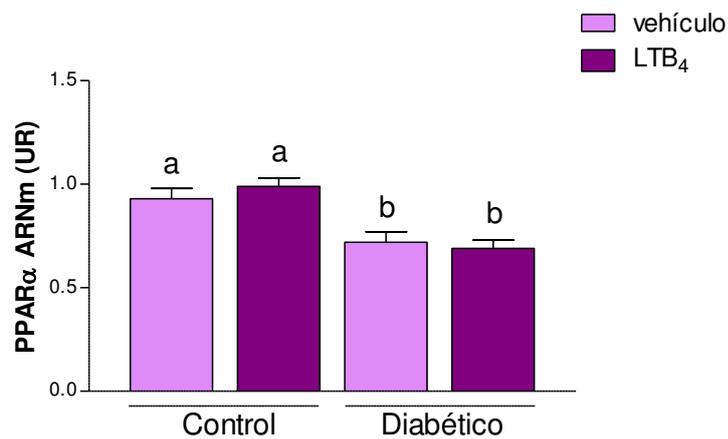


FIGURA 28. Expresión génica de PPAR α en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas, tratados *in vivo* los días 19, 20 y 21 con LTB₄. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p<0,05$.

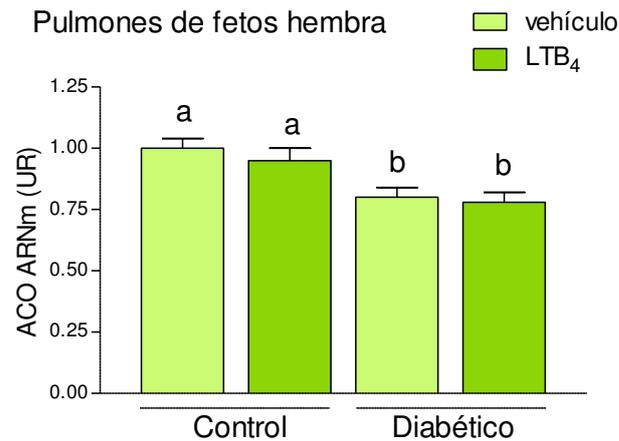
Efecto del tratamiento in vivo con LTB₄ sobre la expresión génica de ACO y CPT1 en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término.

Con el fin de evaluar el efecto del agonista LTB₄ sobre PPAR α , y así regular la expresión genes blanco de dicho receptor involucrados en el catabolismo oxidativo de lípidos, se analizó la expresión génica de ACO y CPT1, en pulmones de fetos hembra y macho inyectados con LTB₄ (0,1 nmoles) o vehículo en los días 19, 20 y 21 de gestación, en grupos de ratas sanas y diabéticas.

En los pulmones de fetos hembra, la administración de LTB₄ no modificó expresión génica de ACO ni en el grupo control ni en el grupo diabético, en comparación con pulmones inyectados con vehículo de los respectivos grupos (FIG 29 A).

En los pulmones de fetos macho, el tratamiento *in vivo* con LTB₄ redujo la expresión génica de ACO en el grupo control respecto a los pulmones de fetos inyectados con vehículo del mismo grupo ($p < 0,01$). A su vez, la inyección intrafetal con LTB₄ no modificó los niveles de ARN mensajero de ACO en los pulmones de fetos de rata diabética. (FIG 29 B)

(A)



(B)

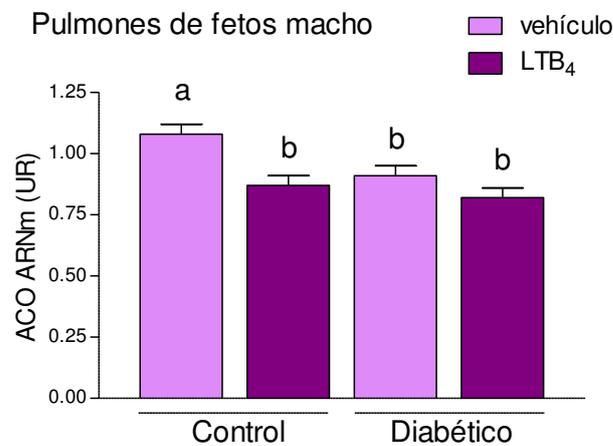
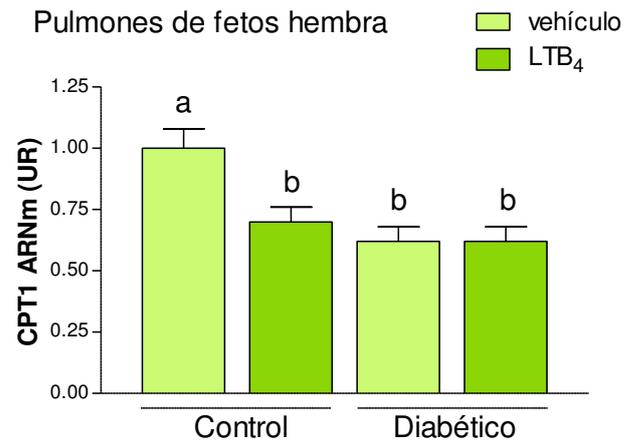


FIGURA 29. Expresión génica de ACO en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas, tratados in vivo los días 19, 20 y 21 de gestación con LTB₄. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p<0,05$.

Al analizar la expresión génica de CPT1, se encontró que la administración intrafetal de LTB₄ redujo los niveles de ARN mensajero de CPT1 en pulmones de fetos hembra de rata control ($p<0,05$), mientras que no los modificó en los pulmones de fetos hembra de rata diabética, en comparación con los pulmones de fetos inyectados con vehículo de sendos grupos (FIG 30 A).

En los pulmones de fetos macho se observó que el agonista de PPAR α analizado no modificó la expresión génica de CPT1 en el grupo control, mientras que en el grupo diabético redujo la expresión génica de esta enzima ($p<0,01$) (FIG 30 B).

(A)



(B)

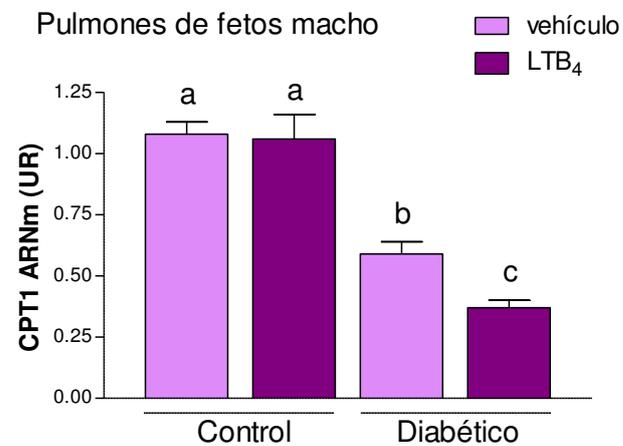


FIGURA 30. Expresión génica de CPT1 en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas, tratados in vivo los días 19, 20 y 21 de gestación con LTB₄. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p<0,05$.

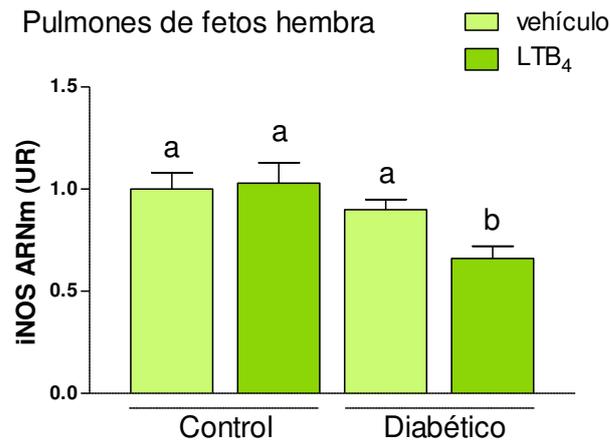
Efecto del tratamiento in vivo con LTB₄ sobre la expresión génica de iNOS en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término.

Dada la alterada producción de NO en los pulmones de fetos macho y hembra de rata diabética que se reportó anteriormente (*Capítulo IV*), se propuso estudiar si la activación de PPAR α , a través de la administración intrafetal de un agonista endógeno, el LTB₄, es capaz de regular la expresión génica de la iNOS en el pulmón fetal.

En los pulmones de fetos hembra se observó que el tratamiento *in vivo* con LTB₄ sólo fue capaz de reducir los niveles de ARN mensajero de iNOS en los pulmones de fetos de rata diabética, respecto a los pulmones de fetos inyectados con vehículo del mismo grupo ($p < 0,01$, FIG 31 A)

Al analizar la expresión génica de iNOS en los pulmones de fetos macho, se observó que la administración intrafetal de LTB₄ fue capaz de reducir los niveles de ARN mensajero de iNOS tanto en el grupo control como en el grupo diabético ($p < 0,05$, FIG 31 B).

(A)



(B)

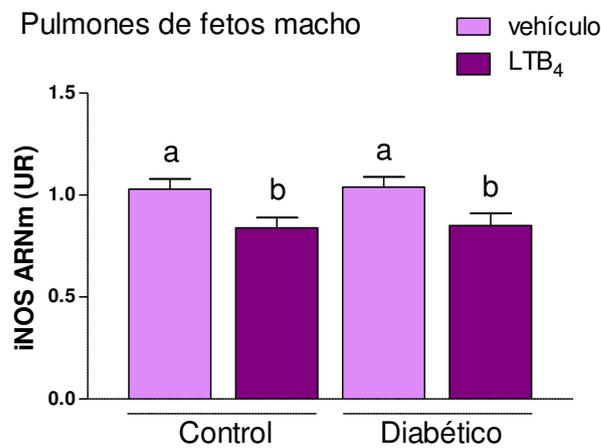


FIGURA 31. Expresión génica de iNOS en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas, tratados *in vivo* los días 19, 20 y 21 de gestación con LTB₄. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p<0,05$.

CAPÍTULO VII

Efecto del tratamiento *in vivo* con 15dPGJ₂, agonista de PPAR γ , en pulmones de fetos de rata diabética en la gestación a término.



El factor de transcripción PPAR γ participa de la diferenciación y maduración pulmonar (Simon *y col.* 2006, Rehan y Torday 2012) y ejerce funciones adipogénicas en el pulmón fetal a término y el pulmón neonatal, etapas que se caracterizan por el incremento en el metabolismo lipídico, de vital importancia para la producción adecuada del surfactante pulmonar (Chen *y col.* 1998).

En el capítulo precedente se observó que la administración de un agonista endógeno de PPAR α , el LTB₄, fue incapaz de regular la anómala expresión génica de enzimas limitantes en la oxidación de lípidos en pulmones fetales inducida por la diabetes materna. Además, teniendo en cuenta que los niveles de PPAR γ también se encuentran alterados en pulmones fetales de ratas diabéticas, resultó interesante evaluar el efecto de la activación de este receptor sobre las anomalías pulmonares observadas. La 15dPGJ₂ es una prostaglandina derivada del ácido araquidónico, que es agonista de PPAR γ y ejerce funciones en diferentes tejidos relacionadas con la homeostasis lipídica y el control de procesos antiinflamatorios (Scher y Pillinger 2005, Heikkinen *y col.* 2007). En este sentido, estudios de nuestro laboratorio mostraron la capacidad de 15dPGJ₂, de regular el metabolismo lipídico en placentas de ratas diabéticas y mujeres diabéticas *in vitro* (Capobianco *y col.* 2008, Capobianco *y col.* 2013).

En el presente capítulo se analizó el efecto de la administración *in vivo* de 15dPGJ₂, agonista endógeno de PPAR γ sobre alteraciones pulmonares inducidas por la diabetes materna. Para ello se siguió el esquema de administración intrafetal que se detalló en la sección materiales y métodos, en el cual se inyectó 15dPGJ₂ en forma

subcutánea a los fetos de ratas sanas y diabéticas, los últimos tres días de la gestación.

Efecto del tratamiento in vivo con 15dPGJ₂ sobre parámetros plasmáticos y peso fetal y peso del pulmón de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en la gestación a término.

Para evaluar el efecto de la administración intrafetal con 15dPGJ₂, agonista de PPAR γ , se procedió tal como se detalló anteriormente en materiales y métodos. Brevemente, la administración de 15dPGJ₂ se llevó a cabo de forma intrafetal, por inyecciones de 15dPGJ₂ 2 nmoles o vehículo en forma subcutánea a los fetos en los días 19, 20 y 21 de gestación a través de breves cirugías en la que se expone el cuerno izquierdo del útero de la rata. En el día 21 de gestación y luego de 3 horas de la última inyección, los fetos fueron explantados, sexados y se determinó el peso fetal y el peso de diversos órganos fetales, se obtuvo el plasma fetal en el cual se determinó la glucemia y la trigliceridemia.

En primer lugar se evaluó la acción de 15dPGJ₂ administrada de forma intrafetal sobre parámetros metabólicos en plasma fetal, y el peso fetal y de diversos órganos fetales.

El tratamiento intrafetal con 15dPGJ₂, en fetos hembra y macho no modificó la glucemia, la trigliceridemia ni el peso fetal en el grupo control ni el grupo diabético (Tabla 9).

Al analizar el efecto de la administración de 15dPGJ₂ sobre el peso de los pulmones fetales se observó que este tratamiento redujo el peso del pulmón de fetos hembra del grupo diabético, llevándolo a valores similares al control ($p < 0,05$, Tabla 9 A). En los fetos macho, el tratamiento intrafetal con 15dPGJ₂, disminuyó el peso del pulmón fetal de ratas sanas ($p < 0,05$), sin modificar significativamente el peso de este órgano en fetos del grupo diabético respecto a los respectivos grupos tratados con vehículo (Tabla 9 B)

(A)Fetos hembra	Control		Diabético	
	Vehículo	15dPGJ₂	Vehículo	15dPGJ₂
Glucemia (mg/dl)	47±5 ^a	54±10 ^a	148±10 ^b	157±10 ^b
Trigliceridemia (g/l)	0,54±0,08 ^a	0,61±0,06 ^{ac}	0,89±0,07 ^b	0,78±0,05 ^{bc}
Peso fetal (g)	3,01±0,04 ^a	2,98±0,06 ^a	3,40±0,11 ^b	3,49±0,11 ^b
Peso pulmón fetal (mg)	90,5±2,6 ^a	92,5±2,1 ^a	98,5±2,1 ^b	90,8±2,3 ^a

(B)Fetos macho	Control		Diabético	
	Vehículo	15dPGJ₂	Vehículo	15dPGJ₂
Glucemia (mg/dl)	45±6 ^a	52±12 ^a	150±12 ^b	156±11 ^b
Trigliceridemia (g/l)	0,55±0,06 ^a	0,58±0,05 ^a	0,91±0,09 ^b	0,81±0,07 ^b
Peso fetal (g)	3,12±0,08 ^a	2,97±0,10 ^a	3,6±0,04 ^b	3,86±0,10 ^b
Peso pulmón fetal (mg)	100,8±2,2 ^a	91,4±2,9 ^b	111±1,5 ^c	104,9±4,1 ^{ac}

TABLA 9. Parámetros plasmáticos y pesos fetales y del pulmón de fetos hembra (A) y macho (B) inyectados en los días 19, 20 y 21 de gestación, con 15dPGJ₂ o vehículo. Se evaluó el conjunto de plasmas de todos los fetos hembra o todos los fetos macho de cada rata. Los valores representan la media ± error estándar; n=12 ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, p<0,05.

Dada la falta de regulación de la expresión génica de enzimas limitantes en la oxidación de lípidos en pulmones fetales de ratas gestantes diabéticas mediante la administración de un agonista de PPAR α , en el presente capítulo se analizó el efecto de la administración *in vivo* de 15dPGJ₂, agonista endógeno de PPAR γ sobre dichas vías de catabolismo lipídico.

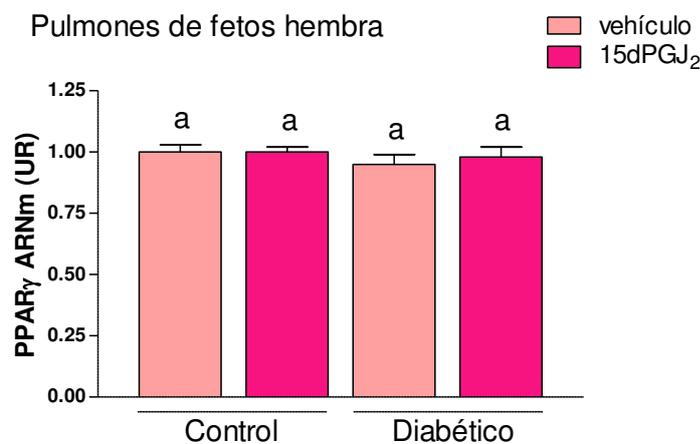
Efecto del tratamiento *in vivo* con 15dPGJ₂ sobre la expresión génica de PPAR γ en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término.

En primer lugar se estudió la capacidad del agonista endógeno de PPAR γ 15dPGJ₂, administrado de forma intrafetal en los últimos tres días de gestación, de regular la expresión génica del propio receptor PPAR γ .

Se encontró que en los pulmones de fetos hembra, la administración *in vivo* de 15dPGJ₂ no modifica la expresión génica de PPAR γ ni en el grupo control ni en el grupo diabético, respecto a los respectivos grupos inyectados con vehículo (FIG 32 A).

En el caso de los pulmones de los fetos machos se encontró que este agonista de PPAR γ , redujo los niveles de ARN mensajero de este receptor, tanto en el grupo control ($p < 0,001$) como en el grupo diabético ($p < 0,01$), respecto a los fetos inyectados con vehículo de sendos grupos (FIG 32 B).

(A)



(B)

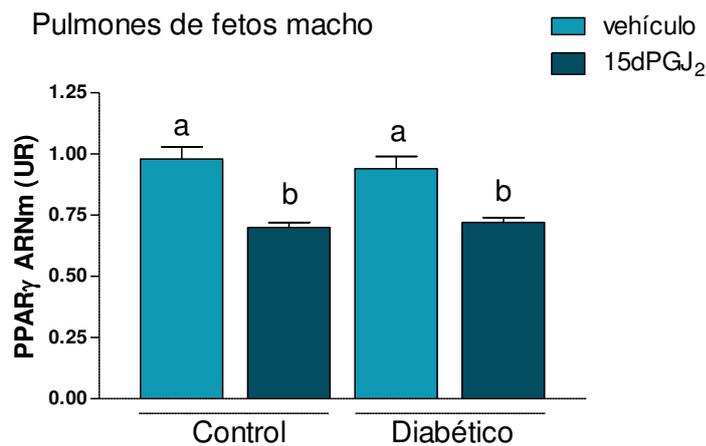
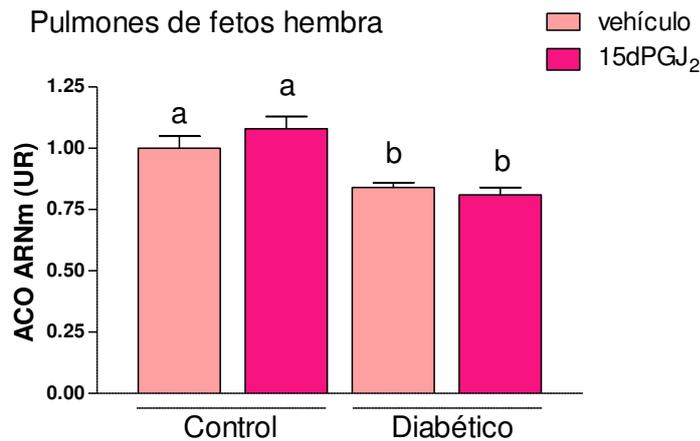


FIGURA 32. *Expresión génica de PPAR γ en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas, tratados in vivo los días 19, 20 y 21 de la gestación con 15dPGJ₂ o vehículo. Los valores representan la media \pm error estándar, n=8 ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.*

Efecto del tratamiento in vivo con 15dPGJ₂ sobre la expresión génica de ACO y CPT1 en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término

Cuando se analizó la expresión génica de ACO, se observó que en los pulmones de fetos hembra, la administración del agonista de PPAR γ , 15dPGJ₂, de forma intrafetal, no modificó los alterados niveles de ARN mensajero de esta enzima en el pulmón fetal de ratas diabéticas (FIG 33 A). Sin embargo, este tratamiento, fue capaz de incrementar la expresión génica de ACO en los pulmones de fetos macho de rata diabética, resultando valores similares a los encontrados en el control ($p < 0,05$, FIG 33 B).

(A)



(B)

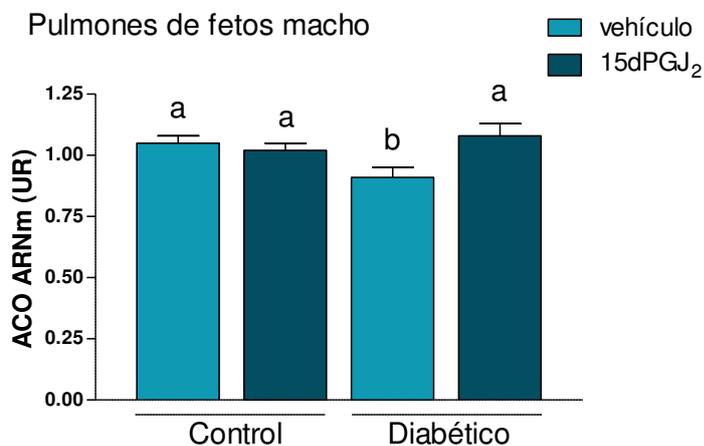
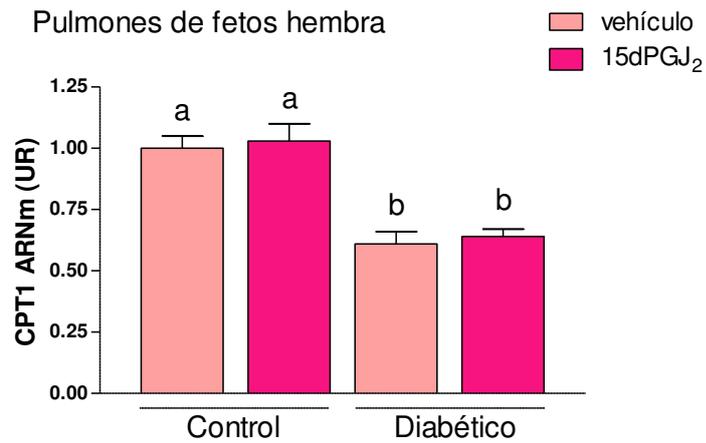


FIGURA 33. Expresión génica de ACO en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas, tratados *in vivo* los días 19, 20 y 21 de la gestación con 15dPGJ₂ o vehículo. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p<0,05$.

Al analizar la expresión génica de CPT1, se observó que la administración intrafetal de 15dPGJ₂, de modo similar a lo observado con la expresión génica de ACO, no modificó los alterados niveles de ARN mensajero de CPT1 en los pulmones de fetos hembra (FIG 34 A), mientras que incrementó la baja expresión génica de CPT1 encontrada en los pulmones de fetos macho de rata diabética ($p< 0,05$, FIG 34 B).

(A)



(B)

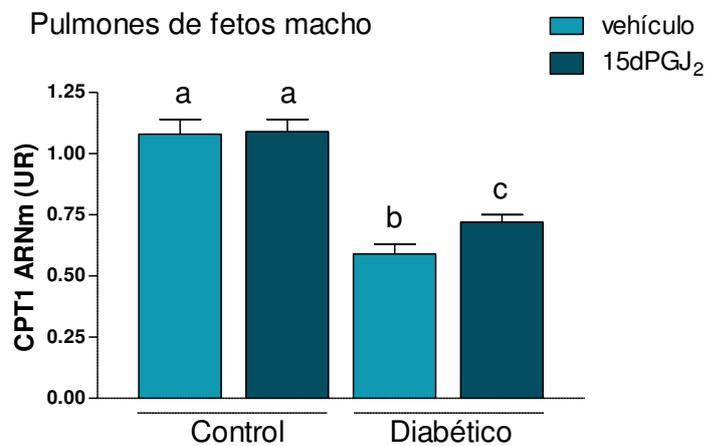


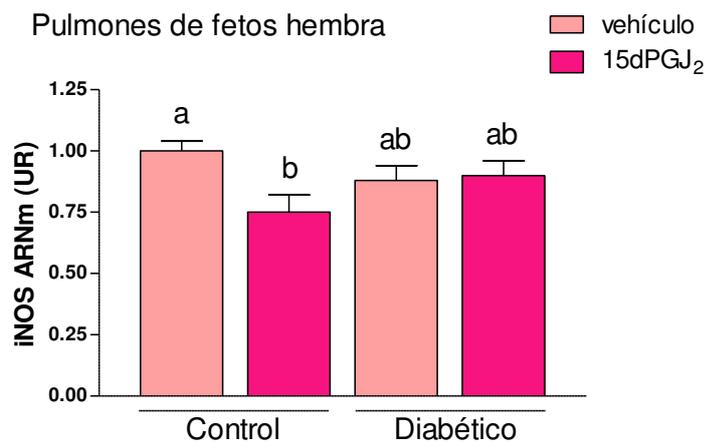
FIGURA 34. Expresión génica de CPT1 en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas, tratados *in vivo* los días 19, 20 y 21 de la gestación con 15dPGJ₂ o vehículo. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p<0,05$.

Efecto del tratamiento *in vivo* con 15dPGJ₂ sobre la expresión génica de iNOS en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término

Dada la capacidad de PPAR γ de regular respuestas anti-inflamatorias en múltiples tipos celulares (Scher y Pillinger 2005), y los alterados niveles de NO encontrados en el pulmón fetal de rata diabética, fue de interés evaluar el efecto de la administración *in vivo* de 15dPGJ₂, agonista de PPAR γ sobre la expresión génica de iNOS.

En los pulmones de fetos hembra, el tratamiento *in vivo* con 15dPGJ₂ redujo la expresión génica de iNOS en el grupo control ($p < 0,05$) respecto a los fetos inyectados con vehículo del mismo grupo, mientras que no se observaron cambios en la expresión génica de esta enzima en los pulmones de fetos hembra del grupo diabético, ni en los pulmones de fetos macho controles ni diabéticos (FIG 35 A y B).

(A)



(B)

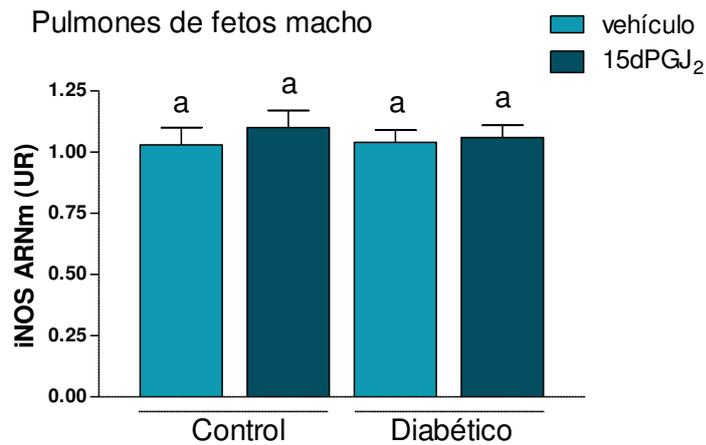


FIGURA 35. Expresión génica de *iNOS* en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas, tratados *in vivo* los días 19, 20 y 21 de la gestación con 15dPGJ₂ o vehículo. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p<0,05$.

CAPÍTULO VIII

Efecto de dietas maternas enriquecidas en ácidos grasos agonistas de PPAR en pulmones de fetos de rata diabética en la gestación a término.



Son considerables las evidencias que ponen de manifiesto el rol de los ácidos grasos dietarios sobre el desarrollo embrio-fetal, así como también las consecuencias del inadecuado aporte materno (Haggarty 2010, Mennitti y col. 2015). Datos experimentales y clínicos evidencian que el aporte nutricional que recibe el feto y su metabolización pueden modular el crecimiento, desarrollo y función del pulmón fetal (Moya 2014). Estudios en distintos modelos experimentales evidenciaron que la suplementación dietaria con PUFAS posee efectos benéficos ante diversas condiciones patológicas en pulmones neonatales (Sosenko y col. 1988, Chao y col. 2003).

Por otra parte, en capítulos anteriores de esta tesis se evidenciaron alteraciones pulmonares inducidas por la diabetes materna y hemos encontrado alteración en los niveles de PPAR y particularidades en las respuestas a agonistas específicos para PPAR α y PPAR γ . Dado que ciertos ácidos grasos insaturados son agonistas de PPAR, se propuso estudiar el efecto de la suplementación dietaria a ratas gestantes con 6% de aceite de oliva o con 6% de aceite de cártamo, ricos en ácido oleico y ácido linoleico respectivamente, sobre parámetros afectados por la diabetes materna vinculados con el metabolismo de los lípidos y la producción de NO.

Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre parámetros plasmáticos y peso fetal y peso del pulmón de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en la gestación a término.

Como se mostró en el capítulo IV el tratamiento dietario con dietas enriquecidas en ácidos grasos agonistas de PPAR no modificó parámetros plasmáticos maternos y fetales como la glucemia y la trigliceridemia.

Al analizar el peso del pulmón de los fetos de ratas que recibieron las dietas suplementadas con aceite de oliva y aceite de cártamo durante toda la gestación, se observó que las dietas evaluadas no modificaron el peso del pulmón fetal en el grupo control en hembras y en machos. En el grupo diabético, la suplementación con aceite de cártamo no modificó el peso del pulmón fetal en fetos hembra y macho, mientras que la dieta suplementada con aceite de oliva fue capaz de reducir el peso del pulmón fetal tanto en fetos hembras ($p < 0,05$, Tabla 10 A) como en fetos macho ($p < 0,01$, Tabla 10, B), llevándolo a valores similares al control.

(A)Fetos hembra	Control			Diabético		
	Estándar	Oliva	Cártamo	Estándar	Oliva	Cártamo
Peso pulmón fetal (mg)	91±1 ^a	90±3 ^a	91±1 ^a	102±2 ^b	94±3 ^a	102±2 ^b

(B)Fetos macho	Control			Diabético		
	Estándar	Oliva	Cártamo	Estándar	Oliva	Cártamo
Peso pulmón fetal (mg)	100±2 ^a	98±2 ^a	95±2 ^a	110±2 ^b	99±2 ^a	104±2 ^b

Tabla 10 Efecto de tratamientos dietarios durante toda la gestación con suplemento de aceite de oliva o cártamo sobre peso del pulmón de fetos hembra (A) y macho (B) en el día 21 de gestación. Los valores representan la media ± error estándar; n=8 ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y pos test de Bonferroni, las letras (a-b) muestran diferencias significativas, $p < 0,05$

Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la concentración de lípidos en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas.

Se analizó la concentración de diversas especies lipídicas en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas o diabéticas alimentadas durante toda la gestación con: a) dieta estándar, b) dieta suplementada con 6% aceite de oliva, rica en ácido oleico o c) dieta suplementada con aceite de cártamo, rica en ácido linoleico. La medición se realizó luego de la extracción de lípidos del tejido pulmonar fetal y separación por TLC.

En los pulmones de fetos hembra se encontró que el tratamiento dietario en la rata gestante con aceite de oliva o aceite de cártamo incrementó los niveles de triglicéridos en el grupo diabético ($p < 0,05$, FIG 36). A su vez ambos tratamientos dietarios disminuyeron las concentraciones de colesterol y ésteres de colesterol en el grupo diabético respecto a los pulmones de fetos de ratas diabéticas alimentadas con dieta estándar ($p < 0,05$, FIG36)

Pulmones fetos hembra

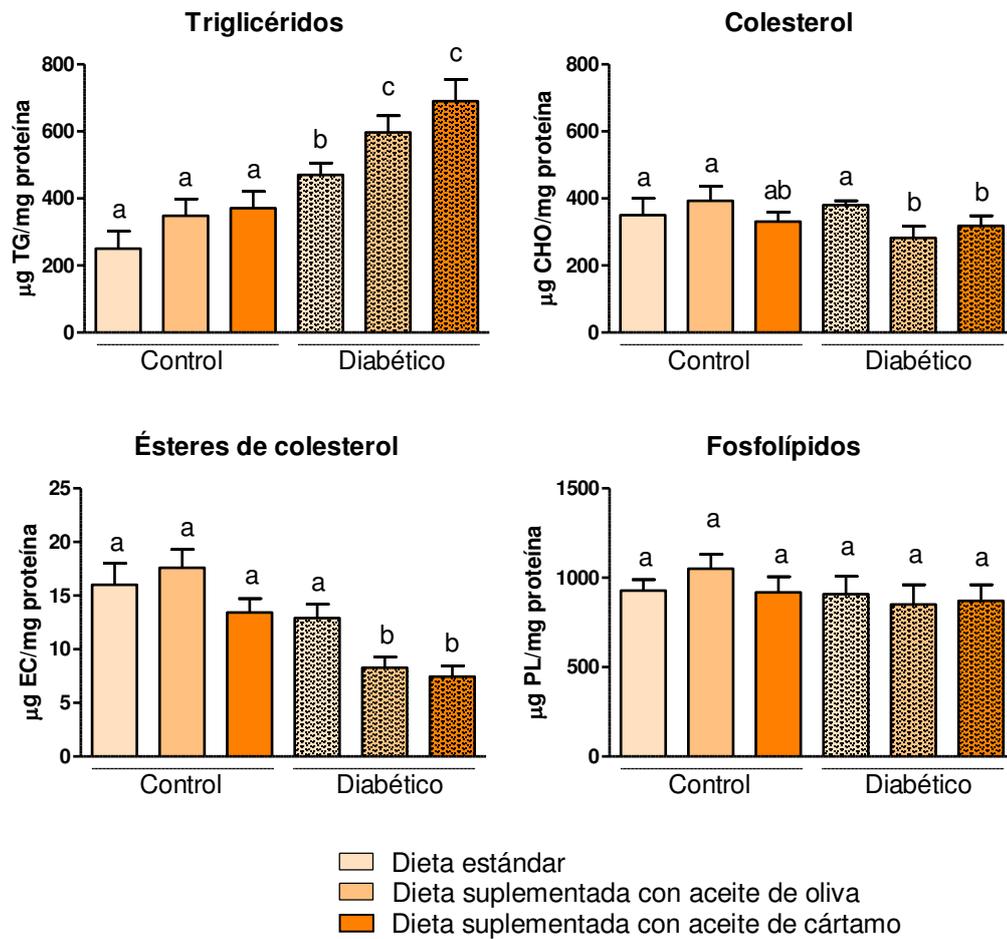


FIGURA 36. Concentraciones de lípidos en pulmones de fetos hembra de ratas sanas y diabéticas tratadas con alimento suplementado con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo durante toda la gestación. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Al analizar el efecto de las dietas maternas sobre las concentraciones de lípidos en el pulmón de fetos macho se encontró que dichos tratamientos no modificaban los niveles de triglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol, en el grupo control ni en el grupo diabético. El tratamiento dietario con aceite de oliva incrementó la concentración de fosfolípidos en los pulmones de fetos de rata diabética, en comparación a los pulmones de fetos del grupo diabético alimentado con dieta estándar ($p < 0,05$, FIG 37).

Pulmones de fetos macho

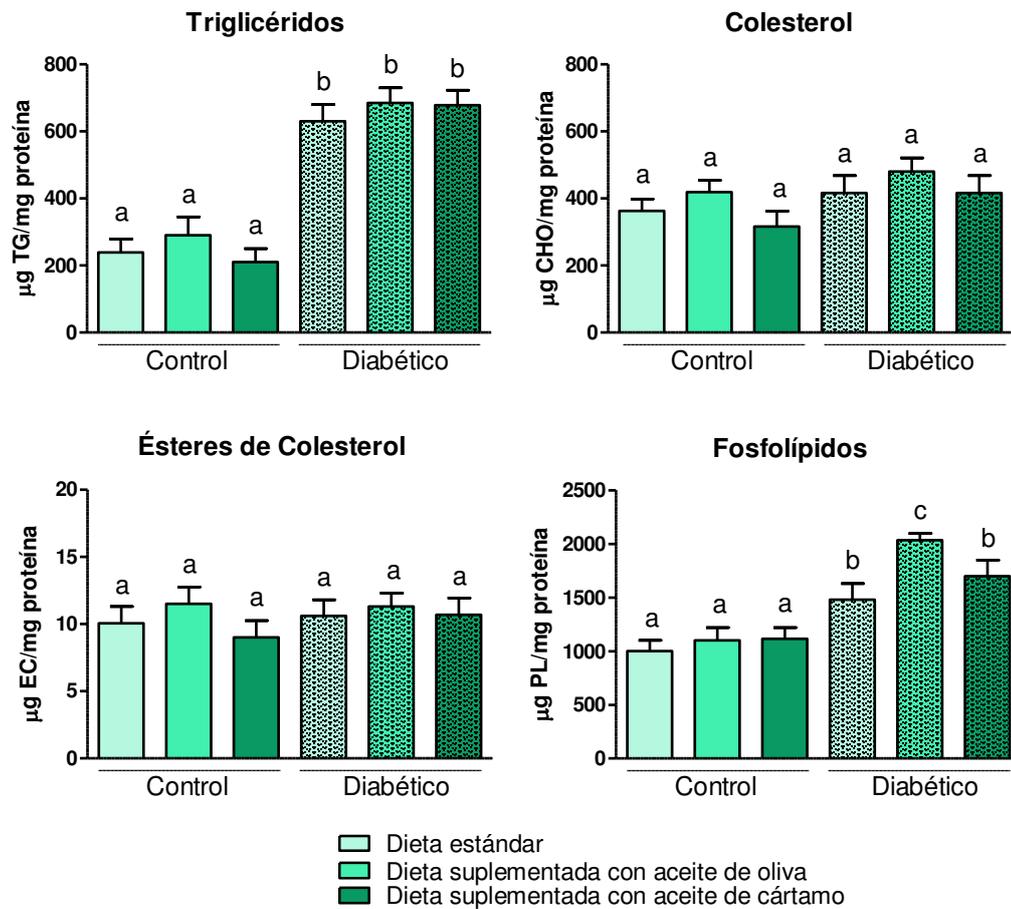


FIGURA 37. Concentraciones de lípidos en pulmones de fetos macho de ratas sanas y diabéticas tratadas con alimento suplementado con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo durante toda la gestación. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p<0,05$.

Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la composición de ácidos grasos en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas en el día 21 de gestación.

Al analizar la composición de ácidos grasos de los pulmones de fetos de ratas sanas y diabéticas que recibieron dietas suplementadas con aceites ricos en ácidos grasos agonistas de PPAR, se observó que en pulmones de fetos de ratas sanas, la suplementación dietaria a las ratas gestantes con aceite de oliva redujo el porcentaje de ácido pentadecanoico y ácido margárico y aumentó el porcentaje de ácido erúcido y ácido araquidónico, respecto a los pulmones de fetos de ratas sanas alimentadas con dieta estándar ($p < 0,05$, TABLA 11). En pulmones de fetos de ratas sanas, la suplementación dietaria con aceite de cártamo condujo a una disminución del porcentaje de ácido pentadecanoico y ácido margárico y a un aumento de ácido behénico, ácido erúcido, ácido linoleico, ácido dihomogama linoleico y ácido araquidónico respecto a los pulmones de fetos de ratas controles alimentadas con dieta estándar ($p < 0,01$, TABLA 11)

En los pulmones de los fetos de ratas diabéticas, la suplementación dietaria con 6% de aceite de oliva disminuyó el porcentaje de ácido erúcido e incrementó los porcentajes de los ácidos grasos insaturados linoleico, dihomogama linoleico y docosapentanoico, en comparación con los pulmones de fetos de ratas diabéticas alimentadas con dieta estándar ($p < 0,01$, Tabla 11). En los fetos de ratas diabéticas la suplementación dietaria a la rata gestante con aceite de cártamo disminuyó el porcentaje de ácido palmitoleico, e incrementó la proporción de los ácidos behénico, linoleico, dihomogama linoleico, araquidónico y docosapentanoico ($p < 0,01$, Tabla 11)

PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS (%)	Control			Diabético			
	Estándar	Oliva	Cártamo	Estándar	Oliva	Cártamo	
C14	Mirístico	1,94±0,24 ^a	1,66±0,33 ^a	2,24±0,06 ^a	2,06±0,21 ^a	2,05±0,09 ^a	1,94±0,10 ^a
C15	Pentadecanoico	1,23±0,28 ^a	0,38±0,03^b	0,42±0,05^b	0,40±0,04^b	0,49±0,10 ^b	0,51±0,05 ^b
C16	Palmitico	32,19±0,56 ^a	31,78±0,61 ^a	32,48±0,66 ^a	33,50±0,18 ^a	31,82±0,69 ^a	31,52±0,39 ^a
C17	Margárico	0,37±0,07 ^a	0,18±0,02^b	0,19±0,02^b	0,23±0,04 ^{ab}	0,21±0,04 ^b	0,23±0,02 ^b
C18	Estearico	11,35±0,16 ^a	11,69±0,40 ^a	12,06±0,31 ^a	11,18±0,86 ^a	11,63±0,42 ^a	12,59±0,31 ^a
C20	Araquídico	0,36±0,03 ^a	0,37±0,02 ^a	0,38±0,04 ^a	0,39±0,03 ^a	0,38±0,16 ^a	0,39±0,16 ^a
C22	Behénico	1,73±0,05 ^a	1,83±0,07 ^a	2,03±0,07^b	1,63±0,20 ^a	1,94±0,08 ^{ab}	2,38±0,10^b
C16:1 (n-7)	Palmitoleico	6,58±0,37 ^a	6,31±0,26 ^a	5,98±0,29 ^a	5,56±0,33 ^{ab}	4,97±0,28 ^{cb}	4,42±0,3^c
C18:1 (n-9)	Oleico	17,33±0,90 ^a	17,68±0,32 ^a	15,78±0,28 ^a	20,19±3,7 ^a	17,74±0,03 ^a	15,63±0,53 ^a
C20:1 (n-9)	Gondoico	0,41±0,05 ^a	0,39±0,03 ^a	0,30±0,02 ^a	0,40±0,05 ^a	0,38±0,03 ^a	0,34±0,02 ^a
C22:1 (n-9)	Eruídico	0,62±0,07 ^a	0,86±0,05^b	0,91±0,04^b	0,69±0,08 ^a	0,46±0,03^c	0,57±0,03 ^a
C18:2 (n-6)	Linoleico	4,85±0,30 ^a	5,09±0,09 ^a	7,10±0,42^b	5,09±0,60 ^a	7,74±0,20^b	8,24±0,50^b
C20:2 (n-3/6)	Ecosadienoico	0,56±0,04 ^a	0,62±0,07 ^a	0,59±0,02 ^a	0,53±0,06 ^a	0,65±0,03 ^a	0,68±0,05 ^a
C20:3 (n-6)	Dihomogama linoleico	0,36±0,04 ^a	0,45±0,03 ^a	0,54±0,02^b	0,37±0,05 ^a	0,56±0,04^b	0,63±0,05^b
C20:4 (n-6)	Araquidónico	10,30±0,33 ^a	11,60±0,17^b	11,37±0,30^b	10,49±0,29 ^a	10,42±0,42 ^a	11,85±0,12^b
C20:5 (n-3/6)	Docosapentanoico	0,36±0,06 ^a	0,30±0,04 ^a	0,27±0,03 ^a	0,32±0,05 ^a	0,49±0,02^b	0,43±0,04^{cb}
C22:6 (n-3)	Docosahexaenoico	2,69±0,10 ^a	2,90±0,10 ^a	2,81±0,30 ^a	3,08±0,38 ^a	2,74±0,27 ^a	3,19±0,22 ^a

Tabla 11 Composición de ácidos grasos en pulmones fetales de ratas sanas y diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo. Los valores representan la media ± error estándar. n=6 ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, p<0,05.

Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la expresión génica del transportador de ácidos grasos (FAT), la sintasa de ácidos grasos (FAS) y el transportador de colesterol ATP-binding cassette 1 (ABCA1) en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas.

Dados los efectos de las dietas maternas sobre los niveles de lípidos en los pulmones fetales de ratas, fue de interés investigar cuáles podían ser las vías por las cuales estos tratamientos dietarios con ácidos grasos agonistas de PPAR, podrían generar los cambios observados en las concentraciones de lípidos pulmonares. Es por ello que se analizó mediante RT-PCR la expresión génica de la sintasa de ácidos grasos (FAS), el transportador de ácidos grasos (FAT) y el transportador de colesterol APT-binding cassette 1 (ABCA1), en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas que recibieron los tratamientos dietarios con 6% de aceite de oliva y 6% de aceite de cártamo desde el día 1 al 21 de gestación.

Al analizar la expresión génica de FAS en pulmones de fetos hembra no se observaron cambios en el grupo control bajo los tratamientos dietarios, mientras que en el grupo diabético el tratamiento dietario a la rata gestante con aceite de oliva incrementó los niveles de ARN mensajero de FAS ($p < 0,05$, FIG 38 A).

En los pulmones de fetos macho, los tratamientos dietarios no modificaron la expresión génica de FAS en el grupo control ni en el grupo diabético (FIG 38 B).

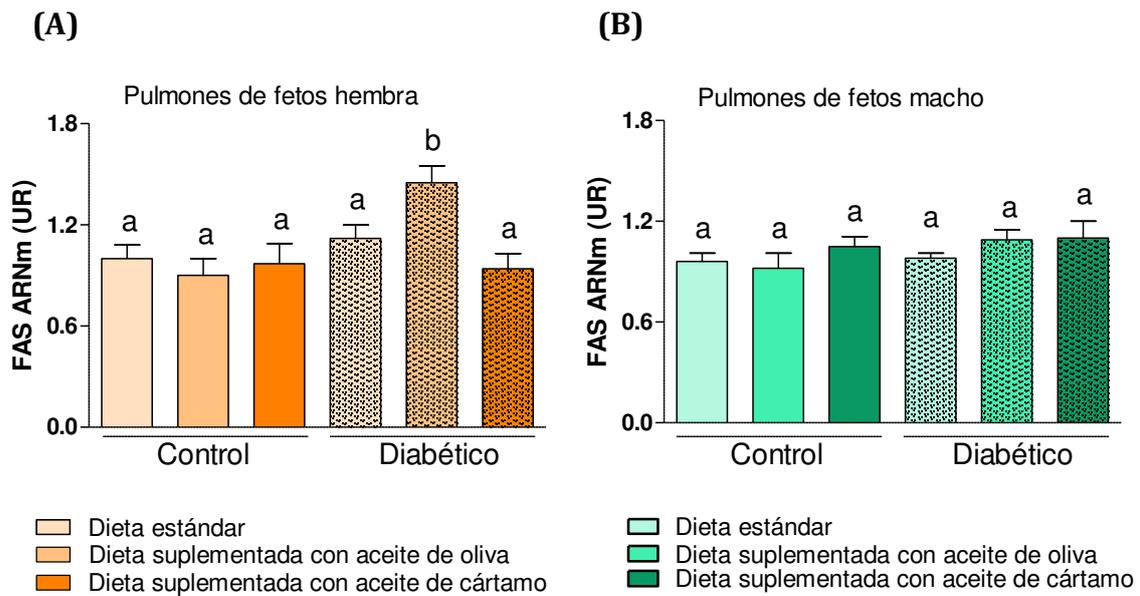


FIGURA 38. *Expresión génica de FAS en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p<0,05$.*

Se analizaron los niveles de ARN mensajero del transportador de ácidos grasos FAT y se observó que tanto en pulmones de fetos hembra como en pulmones de fetos macho del grupo de ratas diabéticas alimentadas con dieta estándar presentan una menor expresión génica de FAT respecto al grupo control de ratas alimentadas con la misma dieta ($p < 0,05$, FIG 39). En los pulmones de fetos hembra se observó que la dieta suplementada con aceite de cártamo fue capaz de incrementar los niveles de ARN mensajero de FAT tanto en el grupo control como en el grupo diabético en comparación con los pulmones fetales de los respectivos grupos alimentados con dieta estándar ($p < 0,05$), mientras que la dieta suplementada con aceite de oliva no modificó la expresión génica de FAT en el grupo control ni en el grupo diabético (FIG 39 A).

En los pulmones de fetos macho se encontró que las dietas suplementadas con aceite de oliva o aceite de cártamo no muestran efectos sobre la expresión génica de FAT, respecto a los pulmones de fetos de ratas alimentadas con dieta estándar de los respectivos grupos (FIG 39 B).

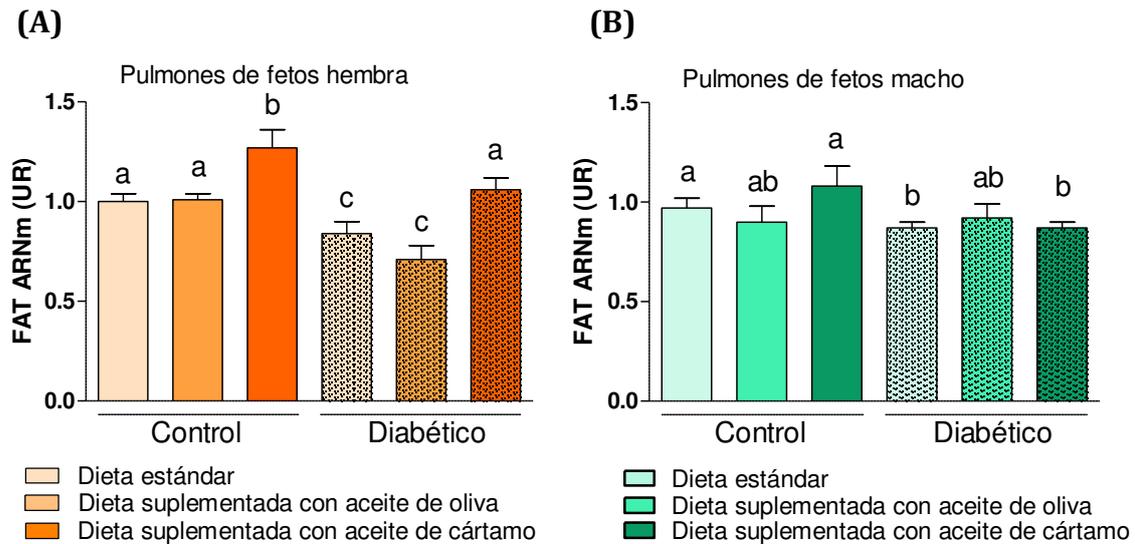


FIGURA 39. Expresión génica de FAT en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p<0,05$.

Al determinar los niveles de ARN mensajero de ABCA1, quien participa del transporte reverso de colesterol, se observó que la expresión génica de dicho transportador en los pulmones de fetos hembra y macho del grupo diabético alimentado con dieta estándar es similar al grupo control alimentado con la misma dieta (FIG 40). La suplementación dietaria a las ratas gestantes con aceite de oliva y aceite de cártamo no modificó la expresión génica de ABCA1 en los pulmones de fetos hembra del grupo control, pero ambas dietas incrementaron los niveles de ARN mensajero de ABCA1 en pulmones de fetos hembra del grupo diabético respecto a los pulmones fetales de ratas diabéticas alimentadas con alimento estándar ($p < 0,05$, FIG 40 A). En los pulmones de fetos machos las dietas suplementadas con aceite de oliva y aceite de cártamo no modificaron los niveles de ARN mensajero ABCA1 en los pulmones fetales del grupo control ni en el grupo diabético (FIG 40 B).

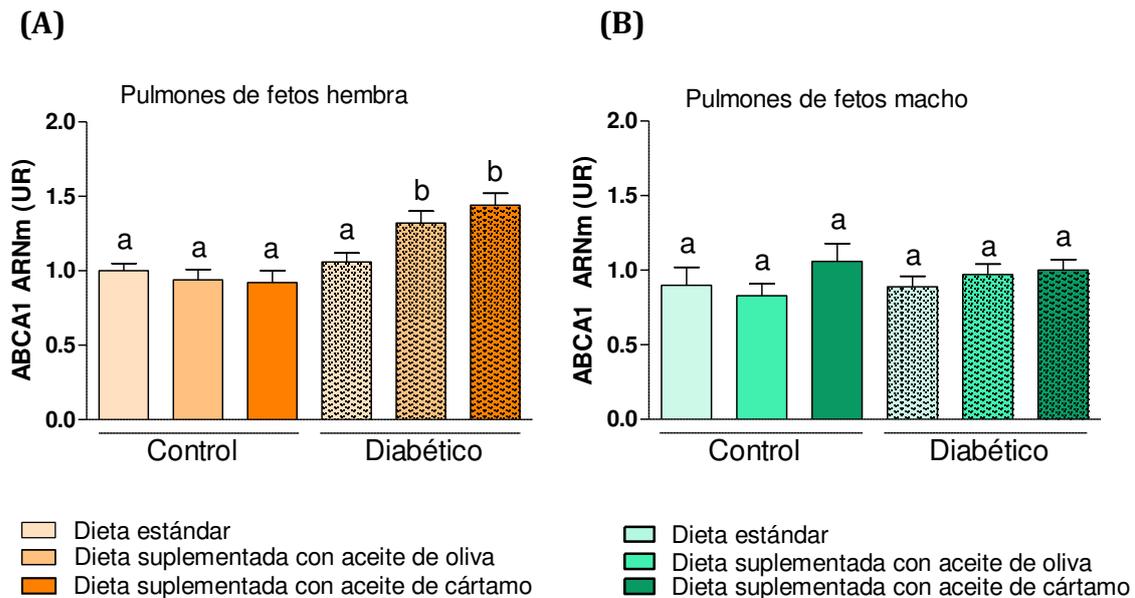


FIGURA 40. Expresión génica de ABCA1 en pulmones de fetos hembra y macho de ratas sanas y diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p<0,05$.

Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la expresión génica de PPAR α y PPAR γ en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas.

Las dietas suplementadas con aceite de oliva y aceite de cártamo, son dietas enriquecidas en ácido oleico y ácido linoleico respectivamente, ambos ácidos grasos agonistas de PPAR. Los resultados hasta aquí mostrados, muestran efectos de estas dietas sobre el metabolismo lipídico en pulmones fetales. Resultó de interés evaluar el efecto de las dietas sobre la propia expresión génica de las isoformas PPAR α y PPAR γ , mediante la técnica de RT-PCR.

Al evaluar los niveles de ARN mensajero de PPAR α , se observó que en los pulmones de fetos hembra, el tratamiento dietario con aceite de cártamo no modificó la expresión génica de este receptor. El tratamiento dietario con aceite de oliva a la rata gestante disminuyó la expresión génica de PPAR α en los pulmones fetales del grupo control, y aumentó la expresión génica de este receptor en el grupo

diabético respecto a lo observado en los pulmones fetales de ratas alimentadas con dieta estándar del mismo grupo ($p < 0,05$, FIG 41 A).

En los pulmones de fetos macho, los tratamientos dietarios no modificaron los niveles de ARN mensajero de PPAR α en el grupo control ni en el grupo diabético en comparación con lo observado en los pulmones de fetos de ratas alimentadas con dieta estándar de los respectivos grupos (FIG 41 B).

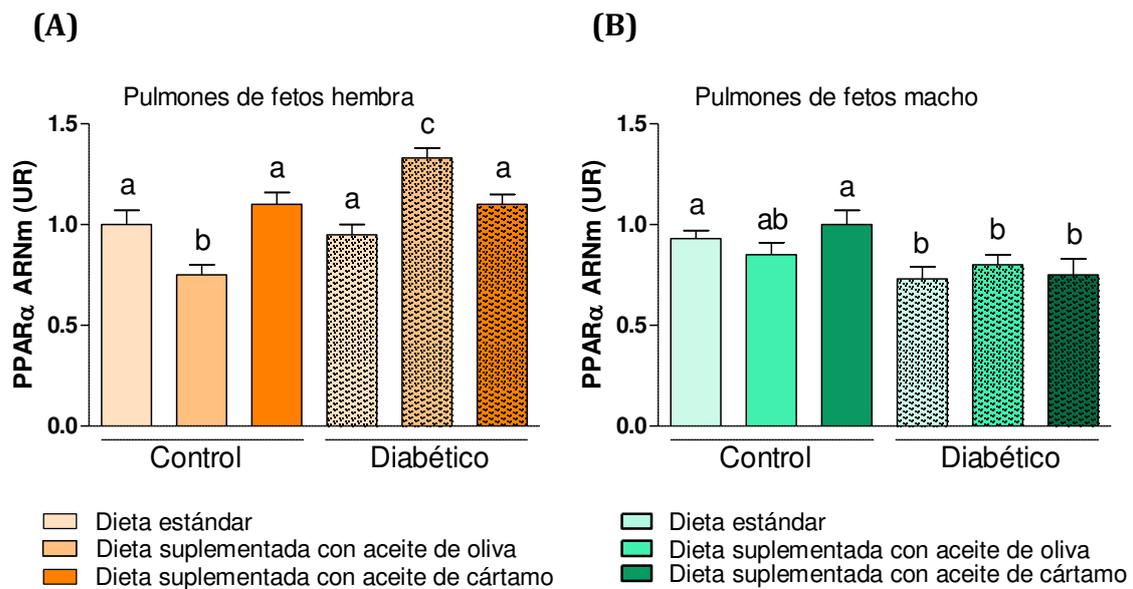


FIGURA 41. Expresión génica de PPAR α en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Al analizar la expresión génica de la isoforma PPAR γ , se encontró que en los pulmones de fetos hembra la dieta suplementada con aceite de oliva no modificó los niveles de ARN mensajero de este receptor, mientras que la suplementación dietaria con aceite de cártamo incrementó la expresión génica de PPAR γ en pulmones fetales tanto en el grupo control ($p < 0,05$) como en el grupo diabético ($p < 0,05$) respecto a los pulmones de fetos de ratas alimentadas con dieta estándar de los respectivos grupos (FIG 42 A).

En los pulmones de fetos macho, los tratamientos dietarios no mostraron efecto sobre la expresión génica de PPAR γ en el grupo control ni en el grupo diabético (FIG 42 B).

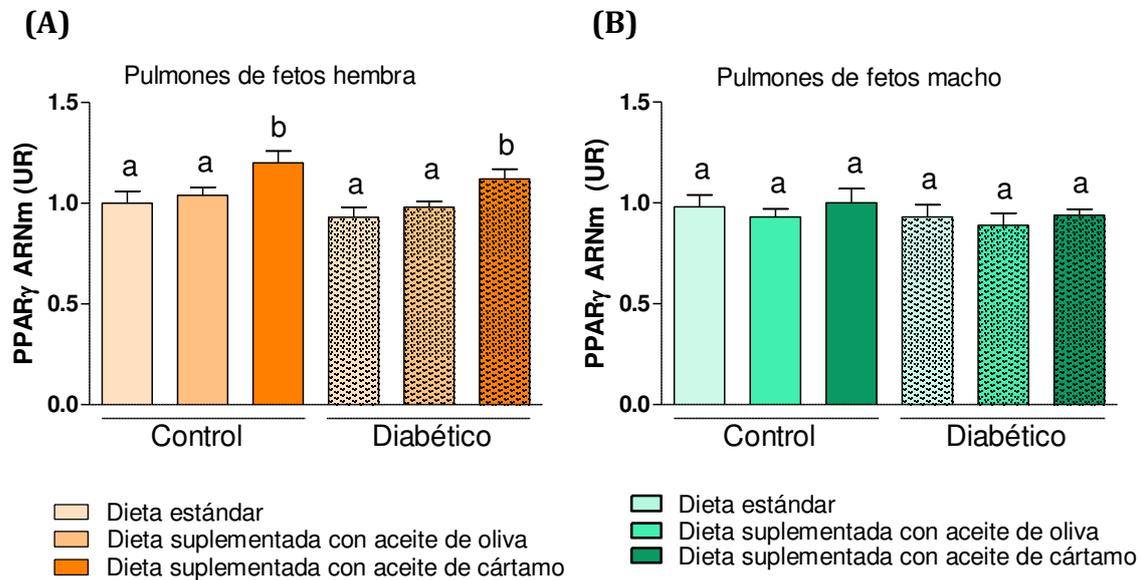


FIGURA 42. Expresión génica de PPAR γ en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo. Los valores representan la media \pm error estándar, n=8 ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p < 0,05$.

Efecto de dietas maternas suplementadas con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la producción de NO y lipoperóxidos en pulmones de fetos hembra y macho en la gestación a término de ratas sanas y diabéticas.

Como se ha mencionado anteriormente los receptores PPAR están involucrados en múltiples mecanismos anti-inflamatorios y anti-oxidantes en distintos tejidos fetales. En la gestación diabética de rata a término, como se mostró anteriormente en el *Capítulo IV*, hay una elevada producción de NO y lipoperóxidos en el pulmón fetal, y la administración intrafetal de un agonista endógeno de PPAR α , LTB $_4$, fue capaz de reducir la expresión génica de la enzima iNOS (*Capítulo V*). Es por esto que resultó de interés evaluar si el tratamiento dietario a ratas gestantes con dietas ricas en ácidos grasos agonistas de PPAR, tienen la capacidad de modular la producción de NO en pulmones fetales en el día 21 de gestación.

Al evaluar la producción de NO, mediante el dosaje de sus metabolitos estables, los nitratos-nitritos, se encontró que tanto en pulmones de fetos hembra como en pulmones de fetos macho los tratamientos dietarios no condujeron a cambios en la producción de NO en el grupo control. En el grupo diabético se observó que el tratamiento dietario con aceite de cártamo no tuvo efecto sobre la producción de NO, pero sí se encontró una disminución de éste en los pulmones fetales de ratas diabéticas alimentadas con dieta suplementada con aceite de oliva ($p < 0,05$, FIG 43)

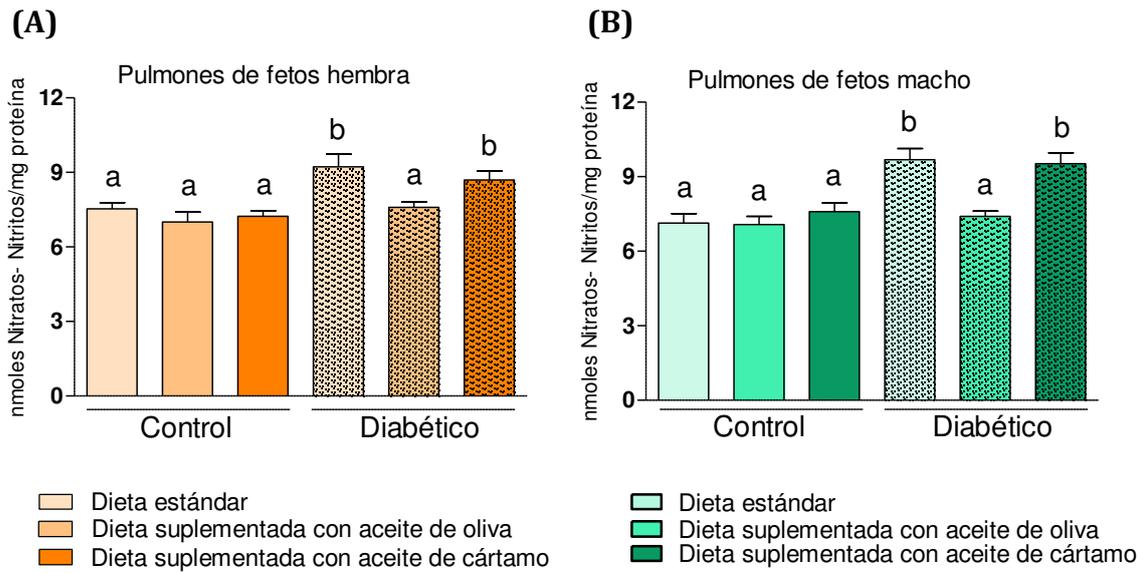


FIGURA 43. Producción de NO en pulmones de fetos hembra (A) y macho (B) de ratas sanas y diabéticas alimentadas durante toda la gestación con dieta suplementada con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo. Niveles de nitratos/nitritos, metabolitos estables del NO en pulmones fetales. Los valores representan la media \pm error estándar, $n=8$ ratas en cada grupo experimental. Test estadístico: ANOVA de dos factores y post-test de Bonferroni. Las distintas letras (a-d) indican diferencias significativas, $p<0,05$.

Discusión



Las recientes estimaciones evidencian una creciente tendencia de padecer diabetes en personas cada vez más jóvenes. De continuar los patrones demográficos actuales, casi 600 millones de personas estarán afectadas por esta patología en una generación. El rápido crecimiento de esta pandemia no sólo se evidencia en el número creciente de personas con diabetes, sino también el creciente número de muertes prematuras debidas a esta enfermedad. La diabetes es sus distintas formas impone altos costos humanos, sociales y económicos en todos los países y en individuos de todos los niveles de ingresos. Recientes análisis estadísticos indican el continuo aumento del número de mujeres que cursan sus embarazos con niveles elevados de glucemia de ayunas en algún momento de la gestación, condición que se estima que afectó a más de 21 millones de nacidos vivos en el 2013.

La diabetes representa una complicación de la gestación, considerándose estos casos como embarazos de riesgo. En efecto, la diabetes materna se asocia a elevados índices de aborto espontáneo, malformaciones congénitas, disfunción placentaria, morbilidad-mortalidad materna y neonatal y alteración de la programación intrauterina contribuyendo a la inducción de anomalías metabólicas, enfermedades cardiovasculares e hipertensión en la vida adulta del neonato (Eriksson 2009, Durnwald y Landon 2013, McCance 2015).

Son múltiples las alteraciones que induce la diabetes materna sobre el feto, y en particular sobre los diferentes órganos fetales, contribuyendo a su anómalo desarrollo y función. Aún se desconocen muchas de las vías que llevan a dichas alteraciones y es aquí donde cobra relevancia el estudio del efecto de la diabetes materna sobre el desarrollo fetal y la identificación de posibles estrategias que prevengan o minimicen el impacto de esta patología sobre el feto, en particular sobre órganos claves como el corazón y el pulmón fetal.

Modelos experimentales de diabetes han permitido el estudio de mecanismos que subyacen a las alteraciones placentarias y embrio-fetales inducidas por la diabetes. (Jawerbaum y White 2010). En este trabajo de tesis se utilizó un modelo de diabetes moderada en rata obtenido por la administración neonatal de estreptozotocina (Portha y col. 1979), que ya ha sido caracterizado en la gestación

por diversos trabajos de nuestro grupo y por otros autores (Jawerbaum y Gonzalez 2005, Martinez *y col.* 2008, Kiss *y col.* 2009, White *y col.* 2010, Martinez *y col.* 2011b, Capobianco *y col.* 2012).

Las ratas gestantes en este modelo experimental de diabetes poseen niveles moderadamente elevados de glucemia, trigliceridemia y colesterolemia, tal como se reportara previamente (Capobianco *y col.* 2008b). Estas características se asemejan a las características que poseen algunas pacientes gestantes diabéticas, aún bajo supervisión médica dada la dificultad de lograr un control metabólico óptimo (Balsells *y col.* 2009, Ferriols *y col.* 2015).

Tal como se describe para este modelo experimental, las ratas diabéticas presentan una deficiente función pancreática como consecuencia de la destrucción y posterior regeneración parcial del páncreas en la etapa neonatal, que se evidencia en la adultez como reducida insulinemia en comparación a ratas sanas (Portha *y col.* 1979). En forma semejante, en las ratas gestantes hemos evidenciado menores niveles de insulina circulante.

Durante la gestación diabética, los incrementados sustratos metabólicos en circulación materna son transferidos desde la madre al feto a través de la placenta (Herrera *y col.* 1985, Herrera *y col.* 2006). En este sentido se pudo evidenciar que en forma paralela a los elevados niveles de glucemia y trigliceridemia materna, los fetos de ratas diabéticas presentan incrementados niveles de glucosa y triglicéridos plasmáticos. Cabe destacar también que el crecimiento fetal se sustenta con los nutrientes que son transferidos desde la circulación materna y que la elevada transferencia de hidratos de carbono y lípidos conduce a un estado anabólico fetal que puede manifestarse en el feto como macrosomía (Jansson *y col.* 2006, Schaefer-Graf *y col.* 2008). En modelos experimentales de diabetes en la gestación, además de evidenciar macrosomía fetal también se evidenció organomegalia (Martinez *y col.* 2011b, White *y col.* 2015). En este trabajo de tesis, tal como se esperaba de acuerdo a los antecedentes mencionados, se encontró mayor peso fetal en el grupo diabético respecto al control. Al mismo tiempo y de forma interesante se evidenció mayor peso del corazón y el pulmón fetal. Resultados similares fueron reportados previamente por Lawrence y colaboradores en un modelo genético de diabetes en ratones, en el que evidencia fetos con fenotipo macrosómico y mayor peso del pulmón fetal (Lawrence *y col.* 1989). Menezes y colaboradores evidenciaron también incremento en el peso fetal de ratas diabéticas (Menezes *y col.* 2001). Estos

hallazgos se evidencian en modelos experimentales de diabetes moderada en la preñez, conociéndose que modelos experimentales más severos conducen a la restricción de crecimiento fetal, y que en la mujer diabética también se evidencia mayor riesgo de macrosomía, pero también de microsomía fetal, esta última asociada al adverso pronóstico y pobre control metabólico (Jawerbaum y White 2010, Lappas y col. 2011, McCance 2015).

El corazón fetal es un órgano que es afectado por la diabetes materna, encontrándose mayores índices de malformaciones cardíacas, alteraciones estructurales y defectos funcionales del corazón (Corrigan y col. 2009, Zielinsky y Piccoli 2012, Pauliks 2015), quedando aún por dilucidar muchos de los mecanismos y las vías involucradas en la patogénesis cardíaca fetal.

Durante la gestación diabética la transferencia en exceso de sustratos metabólicos hacia el feto también se pone de manifiesto en la acumulación de lípidos a nivel placentario y en el hígado del feto (Capobianco y col. 2008b, Martínez y col. 2011b). El presente estudio del metabolismo lipídico en el corazón fetal de ratas diabéticas en la gestación a término, muestra la existencia de importantes alteraciones en la homeostasis lipídica.

Dado que se conoce que en el metabolismo de lípidos múltiples regulaciones son dependientes del sexo y que la prevalencia de enfermedades cardiovasculares es distinta de acuerdo al sexo (Kautzky-Willer y Handisurya 2009, Benz y col. 2012, Oosthuyse y Bosch 2012), se analizó por separado los efectos de la diabetes materna sobre fetos hembra y macho a fin de discernir y dilucidar diferencias entre ambos sexos en el impacto de la diabetes materna sobre el feto y los posibles efectos de intervenciones experimentales. Se evidenció tanto en corazones de fetos hembra como de fetos macho de ratas diabéticas sobreacumulación lipídica. En el grupo diabético, los corazones de fetos hembra evidencian incrementados niveles de fosfolípidos, colesterol y triglicéridos y los corazones de fetos macho incrementados niveles de fosfolípidos, colesterol, triglicéridos y ésteres de colesterol. Este exceso de lípidos podría condicionar la estructura y función del corazón, tal como ocurre en animales obesos adultos donde la acumulación de lípidos en el corazón está asociada a hipertrofia ventricular izquierda, esteatosis miocárdica y cardiomiopatía (Menezes y col. 2001).

El aumento de la concentración de diversas especies lipídicas en corazones de fetos de ratas diabéticas suscitó el análisis de vías de metabolización de lípidos, que pudieran conducir a esta sobreacumulación lipídica y se encontró que los niveles de ARN mensajero de las enzimas limitantes de la vías de la oxidación lipídica mitocondrial y peroxisomal, CPT1 y ACO respectivamente, se encuentran disminuidos en corazones de fetos macho de ratas diabéticas, mientras que sólo la expresión génica de CPT1 se encontró disminuida en los corazones de fetos hembra. También los resultados encontrados por Lindegaard y colaboradores en un modelo genético de diabetes en ratón muestran una disminución en la expresión de diferentes enzimas/transportadores involucradas en el metabolismo lipídico en corazones fetales a término (Lindegaard y Nielsen 2008).

En forma paralela, y en vinculación al exceso de nutrientes y su anómala metabolización, se genera a nivel intrauterino un entorno pro-oxidante y pro-inflamatorio el cual dificulta el normal desarrollo placentario y fetal (Jawerbaum y Gonzalez 2006, Lappas y col. 2011). Estudios previos de nuestro laboratorio identificaron marcadores pro-inflamatorios y pro-oxidantes en placenta e hígado fetal a término (Martinez y col. 2011a, Martinez y col. 2011b).

En corazones adultos la diabetes genera un estado de estrés oxidativo, que se relaciona con alteraciones del metabolismo energético, estrés en el retículo endoplásmico y apoptosis (Li y col. 2007, Palomer y col. 2013) y se han encontrado marcadores de estrés oxidativo y nitrativo que se asocian con diversas manifestaciones de la cardiomiopatía diabética, como la disfunción ventricular, fibrosis y falla cardíaca, estableciendo una relación causal entre exceso de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y la cardiomiopatía diabética (Kayama y col. 2015, Varga y col. 2015). En el presente trabajo, en el cual hemos estudiado el metabolismo lipídico en el corazón fetal, ha sido de interés evaluar el daño producido por las especies reactivas del oxígeno a los lípidos, reflejado por los niveles de peroxidación lipídica y hemos encontrado de forma novedosa elevados niveles de lipoperóxidos en corazones de fetos machos de ratas diabéticas, sin observarse diferencias en los corazones de fetos hembra.

Asociado al estrés oxidativo propio de la patología diabética, el corazón adulto experimenta un estado de inflamación crónica, proceso inducido por citoquinas y mediadores inflamatorios, que pueden contribuir también a la patogénesis cardiovascular en la diabetes (Varga y col. 2015). El factor NF- κ B ha sido implicado

como mediador clave del proceso inflamatorio en la cardiomiopatía diabética siendo uno de los principales reguladores de la expresión de varios genes pro-inflamatorios, entre ellos iNOS, genes pro-fibróticos y genes vinculados al desarrollo de la hipertrofia cardíaca en la diabetes (Lorenzo *y col.* 2011). La sobreproducción de NO es un marcador de procesos inflamatorios que en presencia de estrés oxidativo conduce a la formación de peroxinitritos, capaces de inducir daño a diferentes órganos, incluido el corazón (Mungrue *y col.* 2002, Lappas *y col.* 2011).

Nos interesó en este estudio evaluar la producción de NO en los órganos fetales en estudio, sabiendo que el NO tiene una participación importante en la gestación como morfógeno y que sus concentraciones deben estar finamente reguladas. Tal es así que el NO posee efectos teratogénicos tanto por defecto como por exceso. En el desarrollo del sistema cardiovascular el NO está involucrado en la cardiomiogénesis (Bloch *y col.* 1999) y en la angiogénesis del corazón (Zhao *y col.* 2002) Trabajos previos de nuestro laboratorio hallaron elevada producción de NO en embriones de ratas diabéticas en el período de organogénesis temprana (Jawerbaum *y col.* 2005), así como también incrementada expresión de NOS en la región cardíaca fetal en el período de post-placentación en la gestación diabética (Pustovrh *y col.* 2007). Resultó de interés entonces evaluar la producción de NO a través del dosaje de sus metabolitos estables, los nitratos/nitritos y la expresión génica de la enzima iNOS en corazones fetales de ratas diabéticas, evidenciándose un incremento de la producción de NO tanto en corazones de fetos hembra como de fetos macho, sin observarse cambios en la expresión génica de la enzima iNOS. El incremento de la producción de NO sin cambios significativos en la expresión génica de iNOS, podría deberse a regulación post-traducciona de esta enzima, ya que se han descrito diversos mecanismos de regulación que explicarían diferentes niveles de actividad, incluso en diferentes condiciones fisiopatológicas (Lee *y col.* 2003, Hausel *y col.* 2006). Los resultados de este trabajo de tesis ponen de manifiesto el estado pro-oxidante y pro-inflamatorio inducido por la diabetes materna y que se evidencia en el corazón de fetos a término de ambos sexos.

Estos hallazgos indican que la diabetes materna induce profundas anomalías en la homeostasis lipídica y evidencian marcadores de estrés oxidativo y nitrativo en corazones fetales, suscitando el interés en el estudio de los posibles mecanismos que regulen dichos procesos.

Los receptores nucleares activados por proliferadores peroxisomales son factores de transcripción que regulan la expresión génica de genes blanco vinculados con vías claves del metabolismo de lípidos e hidratos de carbono y con procesos anti-inflamatorios, de crecimiento y de diferenciación celular (Lefebvre y col. 2006, Bensinger y Tontonoz 2008, Wahli y Michalik 2012).

Numerosos trabajos de nuestro laboratorio han descrito la participación de los receptores PPAR en la regulación de anomalías placentarias y embrio-fetales inducidas por la diabetes materna (Capobianco y col. 2005, Capobianco y col. 2008b, Martinez y col. 2008, Jawerbaum y Capobianco 2011, Martinez y col. 2011b).

Debido a la relevancia de las complicaciones inducidas por la patología diabética durante la gestación y a la implicancia que ellas tienen sobre el normal desarrollo fetal, y sabiendo que los PPAR regulan mecanismos que se encuentran alterados en esta patología, ha sido de interés relacionar la actividad de los receptores nucleares PPAR α y PPAR γ con el metabolismo lipídico y nitridérgico en los órganos fetales en estudio de la rata gestante a término.

En el feto en desarrollo PPAR α y PPAR γ comienzan a expresarse en el período de post-placentación y la distribución tisular de los distintos isotipos de PPAR en fetos de rata es similar a la encontrada en tejidos adultos (Braissant y Wahli 1998).

Al estudiar el corazón fetal en el presente trabajo de tesis, de forma interesante se evidencia disminución de la expresión génica de PPAR α y PPAR γ en corazones de fetos macho de ratas diabéticas, mientras que la expresión génica de PPAR α y PPAR γ no se encontró alterada en los corazones de fetos hembra del grupo diabético. Lindegaard y colaboradores estudiando corazones de fetos de ratones sin sexar reportaron una disminución de la expresión de PPAR α en un modelo genético de diabetes (Lindegaard y Nielsen 2008).

Cabe mencionar que PPAR α regula el metabolismo lipídico en corazones neonatales y adultos (Finck 2007). En la adultez PPAR α cumple importantes roles en el corazón participando en la regulación del metabolismo energético y ejerciendo funciones anti-inflamatorias, y su anómala expresión está vinculada con la fisiopatología de diversas enfermedades cardiovasculares (Finck 2007, Yang y Li 2007, Lee y Kim 2015). Ratones nulos para el gen de PPAR α evidenciaron en el

corazón adulto un cambio compensatorio de utilización de sustratos energéticos de ácidos grasos a glucosa y lactato, que es incapaz de generar los niveles de ATP necesarios, conduciendo a falla contráctil del corazón, evidenciando de esta manera que la menor capacidad de utilización de ácidos grasos libres asociada al déficit de PPAR α conduciría a un deterioro progresivo de la función cardíaca (Luptak y col. 2005). También se ha descrito la importancia de PPAR α en la regulación energética y el cambio de utilización de sustratos metabólicos del corazón neonatal en la transición a la vida extrauterina (Steinmetz y col. 2005, Buroker y col. 2008).

Por otro lado, la participación del receptor PPAR γ en la homeostasis lipídica del corazón del adulto ha sido discutida. Luo y colaboradores reportaron que corazones de ratón con cardiomiocitos nulos para el gen de PPAR γ presentaban menores niveles de proteínas claves para la incorporación y oxidación de ácidos grasos, resultando en una menor utilización de ácidos grasos por parte del miocardio y una anómala función contráctil del corazón, exhibiendo hipertrofia y falla cardíaca, sugiriendo que este receptor sería de relevancia en la utilización de ácidos grasos en el corazón adulto (Luo y col. 2010). Otros trabajos en contraposición a lo observado por el grupo de Luo, muestran poca participación del receptor PPAR γ sobre la regulación transcripcional de enzimas del catabolismo lipídico en el corazón, siendo de más relevancia en este proceso las otras isoformas PPAR (Gilde y col. 2003).

La alteración en la vía de los PPAR inducida en el corazón fetal por la diabetes materna podría afectar la homeostasis lipídica, a través de la disminución de la regulación transcripcional de genes involucrados en el catabolismo de los lípidos, pudiendo dar lugar a la sobreacumulación lipídica observada en corazones fetales de ratas diabéticas. A su vez, las relevantes funciones extra-metabólicas relacionadas con el control del estado pro-inflamatorio y pro-oxidante de PPAR α y PPAR γ también podrían estar siendo afectadas por la diabetes materna, conduciendo a la sobreproducción de NO y a los elevados niveles de lipoperóxidos encontrados en los corazones fetales de ratas diabéticas.

Cabe resaltar que la mayoría de alteraciones encontradas en el corazón fetal de ratas diabéticas son dependientes del sexo. De acuerdo a los resultados hallados, y en rasgos generales, el corazón de fetos machos se encuentra particularmente afectado por la diabetes materna, presentando menor expresión génica de PPAR α y PPAR γ , sobreacumulación lipídica, elevada producción de NO y elevados niveles de

lipoperóxidos. Como se mencionó anteriormente el metabolismo de los lípidos se ve influenciado por las hormonas sexuales. A la vez, la vía de señalización de los PPAR también es dependiente del sexo, dados los efectos de los estrógenos y los andrógenos sobre la expresión de los PPAR y el uso común de coactivadores por diferentes receptores nucleares (Collett *y col.* 2000, Yoon 2009, Benz *y col.* 2012). Ratones nulos para el gen de PPAR α exhibieron importante dimorfismo sexual en cuanto a parámetros metabólicos (Costet *y col.* 1998, Li *y col.* 2003) y el bloqueo de la β -oxidación mitocondrial llevó a la letalidad de 100% de los machos mientras que sólo el 25% de las hembras murieron. Además la mortalidad de los machos se redujo con el pre-tratamiento con estradiol, lo cual confirma el entrecruzamiento de las vías de señalización de PPAR α y estrógenos (Djouadi *y col.* 1998). En el mismo sentido diferentes respuestas han sido encontradas en hígado y tejido adiposo de animales adultos para las vías de PPAR α y PPAR γ respectivamente, en las cuales se evidenciaron regulaciones diferenciales entre machos y hembras en cuanto a metabolismo lipídico (Morise *y col.* 2009, Sato *y col.* 2014).

PPAR α cumple importantes funciones en la homeostasis lipídica de tejidos metabólicamente activos como el corazón adulto y diversas vías metabólicas y anti-inflamatorias son reguladas por ligandos de este receptor en el sistema cardiovascular, a través de mecanismos de transactivación y transrepresión (Lefebvre *y col.* 2006, Wahli y Michalik 2012). Teniendo en cuenta que en el corazón fetal de rata diabética, además de la reducción de la expresión génica de PPAR α , los ligandos endógenos de este receptor nuclear podrían estar reducidos, no solo por la lipoperoxidación, que afecta mayormente a los PUFAS, sino también por la deficiencia de las enzimas desaturasas, que son insulino dependientes (Brenner 2003), fue de interés evaluar los efectos de activación de PPAR α por medio de la administración fetal del agonista endógeno LTB $_4$. El LTB $_4$ es un mediador lipídico que cumple un importante papel en la respuesta inflamatoria y que es capaz de actuar como ligando endógeno de PPAR α (Lin *y col.* 1999). Utilizando el modelo experimental de diabetes ya caracterizado en la gestación a término, donde se evidencia macrosomía y organomegalia (Martinez *y col.* 2011b, White *y col.* 2015), se inyectó en forma subcutánea, mediante procedimiento quirúrgico y a través de la pared uterina, al feto en los días 19, 20 y 21 de preñez, vehículo o LTB $_4$, estudiando al feto en el día 21 de preñez. El tratamiento fetal con LTB $_4$ no modificó parámetros plasmáticos como la glucemia y la trigliceridemia en fetos provenientes de los

animales sanos o diabéticos. De forma interesante se encontró que la administración fetal del agonista endógeno de PPAR α LTB₄, fue capaz de incrementar la expresión génica del propio receptor PPAR α tanto en corazones de fetos hembra como de fetos macho en el grupo control y en el grupo diabético. Cabe destacar la capacidad de este agonista de reestablecer a valores control la expresión génica de PPAR α en los corazones de fetos macho en donde la diabetes inducía la disminución de su expresión. Al analizar el efecto de la administración fetal de LTB₄ sobre la expresión génica de ACO y CPT1 en corazones fetales, se observó que acompañando a la mayor expresión génica de PPAR α , el LTB₄ incrementó los niveles de ARN mensajero de ambas enzimas limitantes en la oxidación de lípidos en corazones de fetos machos, donde se encontraban disminuidas en el grupo diabético, si bien solo reguló la expresión génica de ACO en hembras. Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron que la activación de PPAR α con clofibrato o LTB₄ en ensayos *in vitro* y la administración fetal del agonista endógeno LTB₄ regulan anomalías del metabolismo lipídico en hígados fetales de ratas diabéticas a término (Martinez y col. 2011b).

De esta forma, la activación fetal de PPAR α evidencia en el corazón fetal de ratas diabéticas, la capacidad de amplificar la vía de señalización del propio receptor. En el mismo sentido varios trabajos muestran a través de diversos abordajes que la activación de PPAR α lleva a un incremento en la expresión de proteínas involucradas en el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos y a su vez aumenta la tasa de oxidación lipídica en tejidos y células cardíacas murinas (Gilde y col. 2003, Burkart y col. 2007). También, la activación de PPAR α en corazones adultos de rata con el agonista farmacológico clofibrato, muestra cambios en la composición de ácidos grasos, con posibles efectos cardioprotectores (Tian y col. 2006).

El abordaje experimental *in vivo* a través de las inyecciones intrafetales de LTB₄ resultó una valiosa herramienta que permitió la evaluación de ciertos parámetros regulados por PPAR α , limitados por el escaso material biológico disponible, que no nos permitió la evaluación de otros parámetros que contribuyan a comprender de manera más completa los efectos de la activación del receptor PPAR α , como los niveles de lípidos, producción de NO y lipoperóxidos. Es por ello que se continuó el trabajo abordando el efecto de agonistas dietarios de los PPAR.

Sabemos que la diabetes materna afecta el feto y en particular su corazón, debido en parte, al desbalance materno de metabolitos circulantes, que se transfieren al feto conduciendo a la acumulación de lípidos en el corazón, entre otros órganos, y a la inducción de estado pro-oxidante y pro-inflamatorio. Este estado puede alterar la funcionalidad o disponibilidad de biomoléculas claves para el desarrollo, tal es el caso de los lípidos bioactivos. Los ácidos grasos poliinsaturados cumplen importantes funciones en el desarrollo embrio-fetal, no sólo como fuente de energía, sino también para mantener la fluidez, permeabilidad y constitución de las membranas y como moléculas señal y precursores de biolípidos activos tales como prostaglandinas y leucotrienos (Haggarty 2010).

Los ácidos grasos esenciales son ácidos grasos poliinsaturados n-3 y n-6 que no pueden ser sintetizados por la madre ni por el feto, a partir de los cuales se sintetizan los ácidos grasos de cadena larga (LC-PUFAS). LC-PUFAS de la familia n-6 más importantes, derivados del linoleico (18:2 n-6, LA), son el ácido dihomo- γ -linoleico (20:3 n-6) y el ácido araquidónico (20:4 n-6), mientras que los LC-PUFAS de la familia n-3 de relevancia, derivados del α -linolénico (18:3 n-3, ALA), son el ácido eicosapentaenoico (20:5 n-3, EPA) y el ácido docosahexaenoico (22:6 n-3, DHA) (Burdge y Calder 2015).

La deficiencia de ácidos grasos está estrechamente relacionada con la inducción de malformaciones congénitas y alteraciones del desarrollo visual y nervioso (Innis 2007, Demmelmair y Koletzko 2015), así como también incrementar el riesgo de desarrollar enfermedades en la adultez como desórdenes metabólicos y cardiovasculares (Korotkova *y col.* 2005).

Estudios sobre el transporte de ácidos grasos evidenciaron que tanto los ácidos grasos poliinsaturados como los ácidos grasos monoinsaturados provenientes de la dieta materna son transportados de forma facilitada a través de la placenta y sus concentraciones en plasma fetal, a diferencia de lo que se observa con los ácidos grasos saturados, se incrementan en forma lineal con sus concentraciones en plasma materno (Amusquivar y Herrera 2003, Haggarty 2010, Gil-Sanchez *y col.* 2012). Estudios realizados en ratas gestantes tratadas con 10% de aceite de oliva han mostrado incrementos en los niveles plasmáticos de ácido araquidónico, precursor de prostaglandinas y leucotrienos (Amusquivar y Herrera 2003).

En pacientes gestantes con diabetes tipo 1, tipo 2 y gestacional se ha observado deficiencia de PUFAS en sangre de cordón (Min *y col.* 2005, Thomas *y col.* 2005, Ortega-Senovilla *y col.* 2008) y a su vez, en placentas y fetos de rata afectados por la diabetes materna, se ha observado una disminución de diferentes eicosanoides (Jawerbaum *y Gonzalez* 2006), lo cual podría estar vinculado con una disminución en la actividad Δ -5 y Δ -6 desaturasas, enzimas que convierten el ácido linoleico en ácido araquidónico, y que se encuentran alteradas en la patología diabética ya que su expresión es dependiente de la insulina (Brenner 2003).

Estudios previos de nuestro grupo de trabajo evidenciaron alteraciones en el metabolismo lipídico y la producción de eicosanoides en la placenta, (White *y col.* 2002, Jawerbaum *y Gonzalez* 2005), en embriones en período de organogénesis temprana (Higa *y col.* 2007) y en el desarrollo fetal (Capobianco *y col.* 2008a, Martinez *y col.* 2008).

Diversos trabajos evidenciaron efectos benéficos de la suplementación dietaria materna con antioxidantes, ácidos grasos monoinsaturados y PUFAS, en el período de organogénesis temprana, reduciendo la tasa de malformaciones embrionarias, el anómalo metabolismo del ácido araquidónico y la sobreproducción de NO inducidos por la diabetes materna (Reece *y col.* 2006, Higa *y col.* 2010). Por otro lado, la suplementación dietaria con PUFAS n-3 mostró efectos benéficos sobre el fenotipo macrosómico y en el estatus oxidante encontrado en la descendencia de ratas diabéticas y evidenció además capacidad hipolipemiente (Makni *y col.* 2011, Guermouche *y col.* 2014, Yessoufou *y col.* 2015).

Por otro lado, cabe destacar el papel que cumplen ciertos ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados como agonistas de los receptores PPAR, que son capaces de activar a estos receptores a concentraciones nanomolares (Hihi *y col.* 2002, Bordoni *y col.* 2006).

Trabajos previos de nuestro laboratorio evidenciaron la capacidad de dietas suplementadas con ácidos grasos agonistas de los PPAR de prevenir parcialmente la embriopatía inducida por la diabetes a través de la regulación de la vía de señalización de los PPAR que ejercen efectos antiinflamatorios y antioxidantes (Higa *y col.* 2014). Se evidenciaron también los efectos benéficos de dietas ricas en ácido oleico (n-9) o ácido linoleico (n-6), agonistas de PPAR, al regular el metabolismo lipídico y ejercer efectos antiinflamatorios en placentas de ratas diabéticas en el día 13,5 de gestación, así como también prevenir las anomalías en los niveles de la

15dPGJ₂ y la síntesis y acumulación de lípidos en fetos a mediados de la gestación (Capobianco *y col.* 2008a, Capobianco *y col.* 2008b, Martínez *y col.* 2012).

En este trabajo de tesis fue de interés evaluar el efecto de dietas ricas en ácidos grasos agonistas de PPAR sobre las anomalías en el corazón fetal inducidas por la diabetes materna. Se estudió en este trabajo cómo cambios en la composición de ácidos grasos dietarios a través de la suplementación con aceites ricos en ácidos grasos agonistas de PPAR, pueden modular el metabolismo lipídico y nitridérgico en el corazón fetal. Para ello las ratas gestantes sanas y diabéticas recibieron durante toda la gestación dieta estándar o con suplemento del 6% de aceite de oliva o aceite de cártamo. Las dietas suministradas poseen un contenido graso final (11%) que está dentro de los parámetros normales. Si bien el ácido linoleico de mayor abundancia en el aceite de cártamo y su derivado ácido araquidónico activan los tres isotipos de PPAR, estudios de activación génica con gen reportero evidencian que también el ácido oleico, presente en abundancia en el aceite de oliva activa los tres isotipos de PPAR, aunque uniéndose con menor afinidad que los ácidos grasos poliinsaturados (Forman *y col.* 1997).

Evidenciamos que las dietas no modificaron parámetros plasmáticos maternos ni fetales como glucemia y la trigliceridemia y al analizar los niveles de lípidos en los corazones fetales, se encontró que los tratamientos dietarios no generaron cambios sustanciales en las especies lipídicas evaluadas. A diferencia de lo observado tras la activación *in vivo* de PPAR α por su agonista endógeno LTB₄, las dietas suministradas no modificaron los reducidos niveles de ACO y CPT1 encontrados en los corazones de fetos hembra y machos en el grupo diabético. Un hallazgo de interés fue que el tratamiento dietario con ácidos grasos agonistas de PPAR, al igual que el tratamiento *in vivo* con LTB₄, incrementó en el corazón de fetos macho los niveles de mensajero del receptor PPAR α , estimulando la vía de este receptor en el corazón fetal.

Estos resultados evidencian que los tratamientos dietarios con ácidos grasos agonistas de PPAR no estimulan el catabolismo lipídico en el corazón fetal ni afectan la expresión génica de enzimas limitantes del catabolismo de lípidos como ACO y CPT1. Dado que la activación fetal con LTB₄, agonista de PPAR α , conduce a un aumento en la expresión génica de ACO y CPT1 en corazones fetales de ratas diabéticas, evidenciamos que los efectos encontrados a partir de los tratamientos dietarios o de la inyección *in vivo* con un agonista específico de PPAR α desencadenan diferentes respuestas en el corazón fetal de ratas diabéticas. Esto podría deberse a

múltiples factores, incluyendo la forma de acceso del ligando (intrafetal o por dieta materna, es decir, a través de la placenta) y a los cambios conformacionales diferentes que ocurren en los PPAR en presencia de diferentes ligandos y que pueden conducir a diferentes respuestas biológicas (Hostetler *y col.* 2005, Gregoire *y col.* 2009).

Dada la importancia de las funciones relacionadas con el control de procesos pro-inflamatorios y pro-oxidantes que poseen los receptores PPAR también se evaluó la lipoperoxidación y la producción de NO en los corazones fetales de ratas diabéticas sujetas a los distintos tratamientos dietarios, y, de forma novedosa, se observó que la dieta suplementada con aceite de oliva pudo prevenir el aumento de lipoperoxidos evidente en los corazones de fetos macho de ratas diabéticas. En cuanto a la producción de NO ambos tratamientos dietarios redujeron la sobreproducción de NO en corazones de fetos macho del grupo diabético, aunque sólo el tratamiento dietario con aceite de cártamo tuvo efecto en los corazones de fetos hembra. Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado la importancia de la sobreproducción de NO en la patogénesis embrio-fetal inducida por la diabetes materna (Jawerbaum y Gonzalez 2006, Martinez *y col.* 2011a, Martinez *y col.* 2011b).

A partir de los resultados obtenidos de los distintos abordajes para analizar la activación de la vía de los PPAR en el corazón fetal, podría pensarse que el tratamiento intrafetal con LTB₄, agonista endógeno de PPAR α , estaría mediando mecanismos de transactivación que conducen a la regulación positiva de la expresión génica de enzimas de la oxidación de lípidos. En cambio, los efectos de los tratamientos maternos con aceite de oliva y aceite de cártamo ricos en ácidos grasos agonistas de PPAR, que no regulan el metabolismo lipídico en el corazón fetal, pero sí parámetros de daño oxidativo y estado inflamatorio, podría ser el resultado de su acción a través de mecanismos de transrepresión. En este sentido se conoce que distintos ligandos modifican en forma diferente la configuración del receptor PPAR conduciendo a la formación de complejos que resulten en la activación o la represión de genes (Harmon *y col.* 2011, Balanarasimha *y col.* 2014). Para esclarecer este punto serán necesarias próximas investigaciones que profundicen sobre los mecanismos implicados en las respuestas observadas ante la administración de los distintos agonistas de PPAR.

Además de los efectos de la diabetes materna sobre el corazón fetal y el efecto de agonistas de PPAR sobre el metabolismo lipídico, marcadores de estado pro-inflamatorio y pro-oxidativo en este órgano, este trabajo de tesis se centró también en el efecto de la diabetes materna sobre el pulmón fetal.

El pulmón es un órgano que es afectado por la diabetes tanto en adultos como en niños, conociéndose a su vez que la diabetes materna induce alteraciones en pulmón fetal (Milla y Zirbes 2012). En modelos experimentales de diabetes se han evidenciado en este órgano alteraciones estructurales, retraso de la maduración y alteración en la composición del lípido surfactante (Trevino-Alanis *y col.* 2009, Koskinen *y col.* 2012, Lock *y col.* 2013). Los hijos de madres diabéticas poseen mayores riesgos de sufrir síndrome de distrés respiratorio, asfixia perinatal, neumonía y fallas en la adaptación cardiopulmonar (Robert *y col.* 1976, Vela-Huerta *y col.* 2007).

Tal como se describió al comienzo de esta sección, los fetos de ratas diabéticas presentan mayor peso de los pulmones, lo que acompaña al mayor peso fetal. Al investigar los niveles de lípidos en los pulmones fetales se observó que tanto en pulmones de fetos hembra como de fetos macho presentaban sobreacumulación lipídica, de triglicéridos en las hembras y triglicéridos y fosfolípidos en los machos. Posiblemente este aumento tenga origen en la mayor incorporación de lípidos dado el exceso de sustratos metabólicos que son transferidos de la madre al feto, mecanismo necesario para sustentar tanto el crecimiento como la producción de surfactante pulmonar en la gestación a término (Rooney *y col.* 1994). Al analizar la composición de ácidos grasos de los pulmones fetales no se encontraron cambios marcados entre el grupo control y el diabético.

Al analizar la expresión génica de las enzimas limitantes de la oxidación de lípidos peroxisomal y mitocondrial, ACO y CPT1, respectivamente se encontró que ambas se encuentran disminuidas en pulmones de fetos macho y hembra del grupo diabético. Estos resultados son similares a los encontrados en el corazón fetal, y por ello pensamos que la disminución en la expresión génica de estas enzimas podría estar vinculada con la sobreacumulación de lípidos encontrada en los pulmones de fetos de ratas diabéticas.

En la patología diabética, el pulmón adulto muestra alteraciones relacionadas con un ambiente pro-oxidante y pro-inflamatorio, habiendo mostrado estudios experimentales que estas alteraciones se vinculan con la activación de la vía NF- κ B

(Forgiarini *y col.* 2009, Samarghandian *y col.* 2014, Zhang *y col.* 2015). En el mismo sentido, en este trabajo, al analizar el efecto de la diabetes materna sobre el pulmón fetal se encontraron elevados niveles de lipoperóxidos tanto en pulmones de fetos hembra como macho. Estudios en pulmones de neonatos de ratas diabéticas también evidenciaron aumento de lipoperóxidos y menor actividad enzimática antioxidante (Kinalski *y col.* 2000). A su vez en este trabajo de tesis se evidenció elevada producción de NO en los pulmones fetales del grupo diabético, aunque, al igual que lo observado en el corazón fetal, no se hallaron diferencias en la expresión génica de la enzima iNOS. EL NO en condiciones fisiológicas es un importante regulador en la morfogénesis pulmonar (Young *y col.* 2002, Gao y Raj 2010) y su sobreproducción en conjunto con exceso de ROS puede conducir a la producción de peroxinitritos, agente altamente oxidante que induce daño tisular y puede llevar a la muerte celular (Jawerbaum y Gonzalez 2006, Lappas *y col.* 2011).

Se ha descrito la participación de los receptores PPAR en la homeostasis pulmonar, encontrando que PPAR α es un regulador negativo de la respuesta inflamatoria en el pulmón adulto, en donde mostró capacidad de reducir el daño causado por estados inflamatorios de diversa etiología (Cuzzocrea *y col.* 2006, Delayre-Orthez *y col.* 2008, Hecker *y col.* 2015). Becker y colaboradores también evidenciaron que en condiciones inflamatorias la expresión de PPAR α estaba disminuida en pulmones de ratón (Becker *y col.* 2008). Por su parte, la participación del receptor PPAR γ en la regulación de procesos inflamatorios en el pulmón ha sido caracterizada para múltiples patologías de carácter inflamatorio agudo o crónico (Huang *y col.* 2005, Belvisi y Mitchell 2009).

Son pocos aún los trabajos que vinculan a los receptores PPAR con funciones metabólicas en el pulmón. Chen y colaboradores reportaron que previo al nacimiento, aumenta la expresión de PPAR γ en lipofibroblastos en el pulmón fetal y que los cambios en la expresión de este receptor van acompañados de cambios en la expresión de genes blanco relacionados con el metabolismo lipídico (Chen *y col.* 1998).

En este trabajo al analizar la expresión génica de PPAR α y PPAR γ se evidenció que los niveles de ambos receptores están disminuidos en los pulmones de fetos macho de ratas diabéticas, no así en los pulmones de fetos hembra. Estas alteraciones, junto con las anomalías en el contenido de lípidos, la expresión génica de enzimas del catabolismo lipídico, el aumento en la lipoperoxidación y producción

de NO, sugieren que la diabetes materna induce importantes alteraciones en las vías de señalización de los PPAR en el pulmón fetal.

Los hallazgos en las alteraciones en el pulmón fetal inducidas por la diabetes, también evidencian cambios dependientes del sexo fetal. Resultó relevante analizar por separado los efectos en pulmones de fetos machos y hembra teniendo en cuenta, como se mencionó anteriormente, las diferencias metabólicas debidas a la influencia de las hormonas sexuales. Cabe resaltar también que el pulmón es un órgano que en su desarrollo se ve profundamente influenciado por los niveles de testosterona y estrógenos, describiéndose el rol de este último como regulador positivo de la producción del surfactante pulmonar y la alveogénesis, y mostrando una maduración pulmonar más temprana las hembras que los machos (Carey *y col.* 2007, Seaborn *y col.* 2010). Estos cambios, pueden explicar por lo menos en parte, la mayor incidencia de afecciones pulmonares perinatales en machos, como el síndrome de distrés respiratorio fetal, que ha sido ampliamente reportada (Carey *y col.* 2007). En este contexto, también es importante destacar que los neonatos machos de madres diabéticas tienen mayores eventos desfavorables en la etapa perinatal que las hembras (Garcia-Patterson *y col.* 2011).

A partir de las anomalías encontradas en el pulmón fetal, que podrían vincularse con los alterados niveles de los receptores PPAR α y PPAR γ , resultó de particular interés evaluar el efecto de la activación de estos receptores con distintos agonistas.

Siguiendo el esquema de administración *in vivo* del agonista de PPAR α LTB₄ a través de las inyecciones intrafetales en ratas que se detallara anteriormente, se pudo observar que este agonista de PPAR α pudo prevenir el incremento de peso del pulmón fetal inducido por la diabetes materna. Estos resultados son similares a los encontrados por trabajos previos de nuestro laboratorio que evidencian el mismo efecto del agonista LTB₄ en el hígado fetal (Martinez *y col.* 2011b).

A su vez, la administración *in vivo* de LTB₄ no fue capaz de prevenir la anómala expresión génica del receptor PPAR α encontrada en los pulmones de fetos macho de ratas diabéticas y condujo a cambios en la expresión génica de las enzimas limitantes en la oxidación de lípidos ACO y CPT1 en pulmones fetales dependientes del sexo y el estado diabético materno, indicando que PPAR α regula negativamente la expresión génica de estas enzimas con efectos catabólicos, de manera opuesta a

lo observado en otros órganos adultos y fetales, como por ejemplo el hígado (Desvergne *y col.* 2006, Martínez *y col.* 2011b, Capobianco *y col.* 2013).

Estudios de Becker y colaboradores mostraron que en condiciones inflamatorias en el pulmón, la vía de señalización de PPAR α está alterada y que el tratamiento con clofibrato, un agonista farmacológico de este receptor, regula parámetros inflamatorios (Becker *y col.* 2008). De forma interesante el tratamiento intrafetal con LTB $_4$ redujo la expresión génica de la enzima iNOS en los pulmones de fetos macho y hembra en el grupo diabético. Los resultados hallados suman evidencia que sustenta la capacidad del receptor PPAR α de limitar procesos inflamatorios en el pulmón (Delayre-Orthez *y col.* 2008, Hecker *y col.* 2015).

Dada la incapacidad del agonista de PPAR α LTB $_4$, de regular enzimas del catabolismo de lípidos en el pulmón fetal de ratas diabéticas, en forma semejante a la que se evidencia en el corazón u otros órganos (Desvergne *y col.* 2006, Lefebvre *y col.* 2006), y teniendo en cuenta que la activación de PPAR γ regula en placentas y fetos de ratas diabéticas el metabolismo lipídico al mismo tiempo que ejerce efectos anti-inflamatorios (Jawerbaum *y col.* 2002, Capobianco *y col.* 2005), resultó de interés analizar los efectos de la activación del receptor PPAR γ con su agonista endógeno 15dPGJ $_2$. Asimismo, dichos estudios cobran interés ya que el receptor PPAR γ ha mostrado participar del metabolismo de lípidos que componen el surfactante pulmonar a través de ejercer funciones regulatorias en los macrófagos alveolares (Baker 2010). En estos estudios, se utilizó el mismo esquema de administración intrafetal que se había utilizado para evaluar el efecto del LTB $_4$, administrando en este caso 15dPGJ $_2$.

El tratamiento *in vivo* con 15dPGJ $_2$, no modificó parámetros séricos maternos ni fetales como la glucemia ni la trigliceridemia. De forma interesante, al evaluar el efecto de la administración intrafetal de 15dPGJ $_2$ sobre la expresión génica del receptor PPAR γ se observó que en los pulmones de fetos hembra no producía cambios mientras que en los pulmones de fetos macho este tratamiento conducía a la reducción de los niveles de ARN mensajero de dicho receptor, tanto en el grupo control como en el grupo diabético. A su vez este agonista de PPAR γ incrementó la expresión génica de las enzimas ACO y CPT1 en pulmones de fetos macho del grupo diabético.

Además, resultó de interés el análisis de los efectos de la 15dPGJ $_2$ sobre la expresión génica de iNOS en el pulmón fetal de ratas diabéticas, considerando las

conocidas capacidades antiinflamatorias de este agonista natural de PPAR γ en múltiples tejidos, incluido el pulmón, y en diversas condiciones fisiopatológicas (Scher y Pillinger 2005, Cuzzocrea 2006, Liu y col. 2014). Si bien otros trabajos reportaron la capacidad de esta prostaglandina de mediar efectos anti-inflamatorios a través de la regulación de la iNOS en estados inflamatorios (Mendez y LaPointe 2003, Monroy y col. 2007, Zhang y col. 2010), en este trabajo el tratamiento *in vivo* con 15dPGJ₂ no modificó la expresión génica de la iNOS en pulmones fetales en los animales diabéticos. Estos hallazgos, nos permiten mejorar la comprensión del efecto de agonistas específicos de PPAR γ sobre el pulmón fetal, y evidenciar su capacidad de regular o no diversos genes vinculados al metabolismo lipídico y nitridérgico. Dada la limitación de la cantidad de tejido que puede obtenerse a través de estos ensayos de administración intrafetal, se continuaron los estudios evaluando el efecto de la suplementación dietaria con aceites ricos en agonistas dietarios de los tres isotipos de los PPAR.

Debe considerarse que tanto la deficiencia de PUFAS como su suplementación dietaria durante la gestación, ha sido estudiada en pulmones fetales y neonatales en diferentes situaciones fisiopatológicas (Sosenko y col. 1988, Joss-Moore y col. 2010, Moya 2014), pero poco se sabe aún sobre los efectos de dietas enriquecidas con PUFAS en pulmones fetales en la gestación diabética. En este trabajo de tesis se estudió, según el diseño experimental detallado anteriormente, el efecto de dietas suplementadas con aceite de oliva (rica en ácido oleico n-9) o aceite de cártamo (rico en ácido linoleico n-6) durante toda la gestación a ratas gestantes. En primer lugar se evidenció que la dieta materna enriquecida con aceite de oliva disminuyó el peso de los pulmones fetales tanto en hembras como machos del grupo diabético. Si bien Clarck y colaboradores habían reportado que la suplementación dietaria con aceite de cártamo reducía el peso del pulmón fetal de ratas sanas (Clarke y col. 1988), en este trabajo no se observaron cambios en el peso de pulmones fetales de ratas sanas tratadas con dietas ricas en aceite de cártamo.

Al analizar el metabolismo lipídico bajo los tratamientos dietario con aceite de oliva o aceite de cártamo, se observaron diferentes efectos en los pulmones fetales, algunos de ellos sexo-dependientes. El contenido de lípidos en pulmones de fetos hembra del grupo diabético, evidenció aumento de los niveles de triglicéridos y disminución de colesterol y ésteres de colesterol con ambos tratamientos dietarios. En los pulmones de fetos macho sólo se observa incremento de

fosfolípidos en el grupo diabético tratado con aceite de oliva. Este incremento podría generar efectos adversos, tal como ocurre en el hígado fetal y el corazón (Martinez y col. 2011b). Sin embargo, podría también vincularse a procesos de protección como ocurre en la placenta (Capobianco y col. 2008b) o conducir a una mayor disponibilidad de sustratos para la producción de surfactante pulmonar, mecanismo que sería beneficioso en la etapa perinatal.

En cuanto al análisis de la composición porcentual de ácidos grasos en el pulmón fetal se evidenció, en general, un aumento de ciertos ácidos grasos insaturados, tanto en el grupo tratado con dieta suplementada con oliva como con cártamo. Es de interés que si bien es sencillo de explicar el aumento de ácidos grasos poliinsaturados ante las dietas ricas en aceite de cártamo, que brindan ácido linoleico, ácido graso esencial, es difícil de explicarlo ante dietas que no brindan ácidos grasos esenciales como la dieta rica en aceite de oliva. Es por ello que nuestros resultados sugieren que la dieta rica en aceite de oliva, al brindar efectos antioxidantes, posiblemente derivados tanto de los polifenoles que contiene como de su capacidad de activar a los PPAR, está protegiendo a los ácidos grasos esenciales y sus derivados de la lipoperoxidación.

A partir del aumento de algunas especies lipídicas encontrado bajo los tratamientos dietarios, se investigó cuáles podrían ser las vías por las cuales los ácidos grasos incorporados en la dieta aumentan la acumulación de lípidos en los pulmones fetales. Los resultados presentados de los tratamientos *in vivo* con agonistas de PPAR α y PPAR γ , llevarían a pensar que la regulación de la homeostasis lipídica no es como en otros tejidos metabólicamente activos y que podrían estar siendo reguladas otras vías relacionadas con el transporte o la síntesis de ácidos grasos. Es por ello que se analizó la expresión génica de la sintasa de ácidos grasos (FAS), el transportador de ácidos grasos (FAT) y el transportador de colesterol ATP-binding cassette (ABCA1) en pulmones fetales. Cabe resaltar que el pulmón de fetos hembra que presentó acumulación de diversas especies de lípidos, también respondió de manera más contundente a los tratamientos dietarios evidenciando mayor expresión génica de FAS en pulmones del grupo diabético tratado con dieta rica en aceite de oliva y mayor expresión génica de FAT, tanto en el grupo control como en el grupo diabético tratado con dieta rica en aceite de cártamo. De forma interesante, al analizar la expresión génica del transportador de colesterol ABCA1 en pulmones de fetos hembra, se observó que los tratamientos dietarios con ambos

aceites ricos en ácidos grasos agonistas de PPAR, incrementaron la expresión génica de este transportador. Estos resultados sustentan los hallazgos de los reducidos niveles de colesterol y ésteres de colesterol encontrados en los pulmones de fetos hembra de ratas diabéticas bajo el tratamiento con ambas dietas. Estudios previos mostraron que la activación de PPAR α y PPAR γ induce la remoción de colesterol en macrófagos a través de la activación de la expresión génica de ABCA1, estimulando el transporte reverso de colesterol (Chinetti *y col.* 2001, Schmitz y Langmann 2005).

Al analizar la expresión génica de PPAR en pulmones fetales se observa que en pulmones de fetos hembra el tratamiento con aceite de oliva disminuye la expresión génica de PPAR α en el grupo control y lo incrementa en el grupo diabético, evidenciando cambios dependientes del estado metabólico del animal, y que no se presentan en los pulmones de fetos macho. A su vez, PPAR γ sólo presenta incrementos en su expresión génica en los pulmones de fetos hembra sanos y diabéticos de ratas tratadas con aceite de cártamo.

Trabajos previos de nuestro laboratorio han identificado a los tratamientos dietarios ricos en ácido oleico y al ácido linoleico como reguladores del estado inflamatorio en embriones de rata diabética, capaces de prevenir sus efectos deletéreos (Higa *y col.* 2010). En los pulmones fetales de ratas diabéticas se encontró disminución de la producción de NO tanto en fetos hembra como en fetos macho en el grupo de ratas diabéticas alimentadas con dieta suplementada con aceite de oliva. Junto con los hallazgos evidenciados en el corazón fetal, se destaca el resultado del tratamiento dietario efectuado en cuanto a la capacidad de regulación de NO en los órganos fetales estudiados de rata diabética, hallazgo de relevancia que permite pensar en un abordaje sencillo como lo es la dieta, para prevenir las anomalías fetales derivadas de la sobreproducción de NO.

Serán necesarios y de importancia futuros estudios que identifiquen cambios epigenéticos y en la programación intrauterina asociados a los cambios fetales observados y su implicancia en la vida adulta. Varios son los trabajos que evidencian la relación de la nutrición materna y los efectos de la ingesta de ácidos grasos sobre cambios epigenéticos en el feto y la programación intrauterina de enfermedades metabólicas y cardiovasculares. (Burdge y Lillycrop 2014, Mennitti *y col.* 2015). Nuestros recientes estudios evidencian cambios benéficos en la descendencia adulta de ratas diabéticas tratadas con aceite de oliva durante su gestación (Capobianco y

col. 2015), avalando la existencia de efectos fetales benéficos producidos como resultado de tratamientos capaces de regular la actividad de los PPAR a nivel intrauterino.

Conclusiones



En este estudio hemos evidenciado que en el modelo experimental de diabetes utilizado existen alteraciones en el metabolismo materno en la gestación a término, presentando incrementados niveles de glucemia, trigliceridemia y colesterolemia, como resultado de la reducción de los niveles circulantes de insulina. En este contexto la exacerbada transferencia de sustratos metabólicos al feto conducen al desbalance metabólico fetal que presenta incrementados niveles de glucemia y trigliceridemia.

En este estudio se postuló que la diabetes materna conduce a alteraciones en el corazón y el pulmón fetal en la gestación a término relacionadas con la homeostasis lipídica, la producción de NO y la peroxidación lipídica, anomalías que se podrían vincular a alteraciones en las vías de señalización de los receptores PPAR α y PPAR γ .

En este trabajo encontramos que la diabetes materna genera profundos cambios en corazones fetales de ratas diabéticas evidenciando, de forma sexo-dependiente, acumulación lipídica, junto con la disminución de la expresión génica de enzimas de oxidación de lípidos ACO y CPT1. Asociados a los desbalances metabólicos inducidos por la diabetes materna que provee incrementados niveles de sustratos oxidables, se evidenció en corazones fetales sobreproducción de NO y elevados niveles de lipoperóxidos. Además, en el corazón de los fetos macho, observamos reducida expresión génica de los receptores PPAR α y PPAR γ . Estos hallazgos sugieren que la vía de los PPAR podría encontrarse vinculada a la desregulación de la homeostasis lipídica y a los elevados niveles de marcadores pro-inflamatorios y pro-oxidantes evidentes en el corazón de fetos de rata diabética.

PPAR α , es un importante regulador del metabolismo energético y de procesos inflamatorios en órganos metabólicamente activos, entre ellos el corazón. En este trabajo, de forma interesante, encontramos que la activación de PPAR α , por medio de inyecciones intrafetales con LTB₄ los tres últimos días de la

gestación, regularon en el corazón fetal de ratas diabéticas la anómala expresión génica de enzimas de oxidación de lípidos ACO y CPT1 y fueron capaces de incrementar la expresión génica de PPAR α , evidenciando la capacidad de esta vía de regular efectos catabólicos, y regulando a su vez el peso de este órgano fetal.

Por otro lado, tratamientos dietarios con suplementación de aceite de oliva o aceite de cártamo ricos en ácidos grasos agonistas de PPAR, si bien modificaron los niveles de algunas especies lipídicas, no ejercieron efectos catabólicos ni modificaron la expresión génica de enzimas clave en procesos de oxidación de lípidos. De forma interesante los tratamientos dietarios incrementaron la expresión génica de PPAR α y PPAR γ en corazones de fetos macho y al mismo tiempo redujeron la producción de NO y lipoperóxidos, hallazgos que muestran que estos ácidos grasos agonistas de PPAR podrían estar regulando vías inflamatorias y oxidantes alteradas por la diabetes materna.

Los resultados de este estudio demuestran además, la importante capacidad de la activación de la vía de los PPAR por diversos ligandos, de amplificar su propia vía de señalización en el corazón fetal afectado por la diabetes materna.

Por otra parte, los hallazgos presentados hasta aquí, también suman evidencia a la influencia del sexo sobre el impacto de la diabetes, y la regulación diferencial de la vía de los PPAR, posiblemente debido a la interacción entre esta vía y la de las hormonas sexuales, en este caso a nivel del corazón fetal.

El **pulmón fetal** es otro órgano que se ve claramente afectado por la diabetes materna. Este estudio de tesis permitió identificar anomalías en el pulmón fetal de rata diabética evidenciándose acumulación lipídica y disminución en la expresión génica de enzimas limitantes en la oxidación de lípidos. La sobreproducción de NO es un indicador de estado pro-inflamatorio en la patología diabética y en este trabajo encontramos que su producción se encuentra incrementada en los pulmones fetales del grupo diabético. A la vez, los pulmones de fetos de ratas diabéticas presentaron incrementado daño oxidativo a lípidos. Cabe destacar también que la expresión de los receptores PPAR α y PPAR γ se encontró disminuida por efecto de la diabetes materna en los pulmones de fetos macho.

En forma similar a lo reportado en los corazones fetales, los hallazgos en el pulmón fetal evidencian una importante regulación sexo dependiente.

Al analizar la participación del receptor PPAR α sobre la regulación de los parámetros alterados por la diabetes materna, se realizaron tratamientos *in vivo* a través de inyecciones intrafetales con LTB₄, agonista endógeno de PPAR α . A diferencia de lo observado en otros tejidos en que PPAR α presenta efectos catabólicos, el tratamiento intrafetal con LTB₄, mostró no ejercer incrementos en la expresión génica de enzimas de oxidación de lípidos. Sí se observó disminución de la expresión génica de iNOS, posiblemente vinculado a efectos anti-inflamatorios y regulación del peso de este órgano fetal.

Considerando estos resultados, se evaluó la participación del receptor PPAR γ sobre la regulación de las alteraciones observadas en el pulmón fetal de ratas diabéticas, objetivo que se llevó a cabo mediante inyecciones intrafetales de 15dPGJ₂ los últimos tres días de la gestación. La 15dPGJ₂ es agonista endógeno de PPAR γ que posee efectos moduladores del metabolismo lipídico y claros efectos anti-inflamatorios en diversos tejidos. Este estudio mostró la capacidad de este receptor de incrementar la expresión génica de ACO y CPT1 sólo en el corazón de fetos machos, nuevamente evidenciando la regulación diferencial entre machos y hembras de la vía de señalización de PPAR.

Los aportes de los tratamientos dietarios con aceite de oliva y aceite de cártamo ricos en ácidos grasos agonistas de PPAR fueron de interés ya que evidencian la capacidad de generar cambios en el metabolismo lipídico en el pulmón fetal de rata diabética. Cabe resaltar que ambos tratamientos dietarios redujeron los niveles de colesterol, mientras que incrementaron los niveles de triglicéridos en los pulmones de los fetos hembra, modificaciones que van acompañadas de incremento en la expresión génica en el transportador de colesterol ABCA1, FAS y FAT. En el pulmón fetal de machos sólo se observó incremento en los niveles de fosfolípidos ante el tratamiento con aceite de oliva. En forma interesante, ambos tratamientos dietarios y en ambos sexos condujeron a un incremento en los niveles de diversos ácidos grasos insaturados y poliinsaturados en el pulmón fetal. Además, el tratamiento con aceite de oliva reguló el peso de este órgano y la anómala producción de NO en el pulmón fetal inducida por la diabetes materna.

En forma paralela, estas dietas maternas incrementaron la expresión génica de PPAR α y PPAR γ en pulmones de fetos hembra de rata diabética, lo que

evidencia la capacidad de los ácidos grasos insaturados provistos con las dietas de amplificar la vía de señalización de los PPAR.

Es importante mencionar también que los resultados obtenidos con los tratamientos dietarios muestran variaciones con el tipo de dieta, posiblemente indicando la capacidad que tienen los diferentes ligandos endógenos de los PPAR de generar su respuesta biológica.

Este trabajo de tesis permitió identificar alteraciones en corazones y pulmones fetales inducidos por la diabetes materna sobre el metabolismo de los lípidos, la producción de NO y lipoperóxidos, así como también la expresión génica de PPAR α y PPAR γ . Los tratamientos con agonistas de PPAR, además de permitir evaluar la participación de estos receptores como reguladores de dichas anomalías, permite pensar en seguir explorando estas vías regulatorias como posibles blancos terapéuticos que minimicen los efectos de la diabetes materna sobre órganos fetales, como el corazón y el pulmón. Cabe destacar que este trabajo muestra además, la influencia del sexo fetal no sólo sobre el impacto de la patología diabética en el desarrollo fetal, sino también en la respuesta a la activación de los PPAR.

La suplementación dietaria con ácidos grasos insaturados mostró efectos benéficos sobre algunas alteraciones asociadas a la diabetes en la gestación en el corazón y el pulmón fetal, lo cual abre nuevos caminos y plantea nuevos interrogantes sobre la potencialidad de dichas dietas como abordajes terapéuticos en la gestación diabética.

En base a lo presentado en este trabajo de tesis podemos concluir que los PPAR son receptores con importantes funciones reguladoras de la homeostasis lipídica, la producción de NO y la lipoperoxidación, de manera sexo dependiente, en el corazón y el pulmón fetal de rata diabética. Estos órganos fetales evidencian diversas anomalías que se vinculan con el desbalance del metabolismo de los lípidos y marcadores pro-inflamatorios y pro-oxidantes, que se presentan en forma paralela a anomalías en la expresión de los receptores PPAR α y PPAR γ . Hallazgos de este trabajo de tesis demuestran también la capacidad de agonistas de PPAR α y PPAR γ de regular las alteraciones fetales provocadas por la diabetes materna.

Referencias bibliográficas



- Abbott, B. D. (2009). "Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development." *Reprod Toxicol* 27(3-4): 246-257.
- Abbott, B. D., C. R. Wood, A. M. Watkins, K. P. Das y C. S. Lau (2010). "Peroxisome proliferator-activated receptors alpha, Beta, and gamma mRNA and protein expression in human fetal tissues." *PPAR Res* 2010: 1-19.
- Abdelmegeed, M. A., K. H. Moon, J. P. Hardwick, F. J. Gonzalez y B. J. Song (2009). "Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha in fasting-mediated oxidative stress." *Free Radic Biol Med* 47(6): 767-778.
- Abman, S., J. Kinsella y J. Mercier (1999). *Nitric Oxide and Endothelin in the Developing Pulmonary Circulation: Physiologic and Clinical Implications*, Springer New York.
- Aerts, L. y F. A. Van Assche (2003). "Intra-uterine transmission of disease." *Placenta* 24(10): 905-911.
- Aljada, A., R. Garg, H. Ghanim, P. Mohanty, W. Hamouda, E. Assian y P. Dandona (2001). "Nuclear factor-kappaB suppressive and inhibitor-kappaB stimulatory effects of troglitazone in obese patients with type 2 diabetes: evidence of an antiinflammatory action?" *J Clin Endocrinol Metab* 86(7): 3250-3256.
- American Diabetes Association (2015). "2. Classification and Diagnosis of Diabetes." *Diabetes Care* 38(Supplement 1): S8-S16.
- Amusquivar, E. y E. Herrera (2003). "Influence of changes in dietary fatty acids during pregnancy on placental and fetal fatty acid profile in the rat." *Biol Neonate* 83(2): 136-145.
- Aoyama, T., J. M. Peters, N. Iritani, T. Nakajima, K. Furihata, T. Hashimoto y F. J. Gonzalez (1998). "Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)." *J Biol Chem* 273(10): 5678-5684.
- Araujo, J. R., E. Keating y F. Martel (2015). "Impact of gestational diabetes mellitus in the maternal-to-fetal transport of nutrients." *Curr Diab Rep* 15(2): 569.
- Arck, P., B. Toth, A. Pestka y U. Jeschke (2010). "Nuclear receptors of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) family in gestational diabetes: from animal models to clinical trials." *Biol Reprod* 83(2): 168-176.
- Aronson, D. y E. J. Rayfield (2002). "How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms." *Cardiovasc Diabetol* 1: 1.
- Auboeuf, D., J. Rieusset, L. Fajas, P. Vallier, V. Frering, J. P. Riou, B. Staels, J. Auwerx, M. Laville y H. Vidal (1997). "Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients." *Diabetes* 46(8): 1319-1327.
- Balanarasimha, M., A. M. Davis, F. L. Soman, S. D. Rider, Jr. y H. A. Hostetler (2014). "Ligand-regulated heterodimerization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha with liver X receptor alpha." *Biochemistry* 53(16): 2632-2643.
- Balsells, M., A. Garcia-Patterson, I. Gich y R. Corcoy (2009). "Maternal and fetal outcome in women with type 2 versus type 1 diabetes mellitus: a systematic review and metaanalysis." *J Clin Endocrinol Metab* 94(11): 4284-4291.
- Barak, Y., M. C. Nelson, E. S. Ong, Y. Z. Jones, P. Ruiz-Lozano, K. R. Chien, A. Koder y R. M. Evans (1999). "PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development." *Mol Cell* 4(4): 585-595.

- Barak, Y., Y. Sadovsky y T. Shalom-Barak (2008). "PPAR Signaling in Placental Development and Function." *PPAR Res* 2008: 142082.
- Barbour, L. A., C. E. McCurdy, T. L. Hernandez, J. P. Kirwan, P. M. Catalano y J. E. Friedman (2007). "Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes." *Diabetes Care* 30 Suppl 2: S112-119.
- Becker, J., C. Delayre-Orthez, N. Frossard y F. Pons (2008). "Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha expression during lung inflammation." *Pulm Pharmacol Ther* 21(2): 324-330.
- Belvisi, M. G. y J. A. Mitchell (2009). "Targeting PPAR receptors in the airway for the treatment of inflammatory lung disease." *Br J Pharmacol* 158(4): 994-1003.
- Bensinger, S. J. y P. Tontonoz (2008). "Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors." *Nature* 454(7203): 470-477.
- Benz, V., U. Kintscher y A. Foryst-Ludwig (2012). "Sex-specific differences in Type 2 Diabetes Mellitus and dyslipidemia therapy: PPAR agonists." *Handb Exp Pharmacol*(214): 387-410.
- Benzadon, M., L. Forti y I. Sinay (2014). "[Update on the diagnosis of diabetes]." *Medicina (B Aires)* 74(1): 64-68.
- Berg, A. H., T. P. Combs y P. E. Scherer (2002). "ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism." *Trends Endocrinol Metab* 13(2): 84-89.
- Berger, J. y D. E. Moller (2002). "The mechanisms of action of PPARs." *Annu Rev Med* 53: 409-435.
- Blanquart, C., O. Barbier, J. C. Fruchart, B. Staels y C. Glineur (2002). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) turnover by the ubiquitin-proteasome system controls the ligand-induced expression level of its target genes." *J Biol Chem* 277(40): 37254-37259.
- Bligh, E. G. y W. J. Dyer (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can J Biochem Physiol* 37(8): 911-917.
- Bloch, W., B. K. Fleischmann, D. E. Lorke, C. Andressen, B. Hops, J. Hescheler y K. Addicks (1999). "Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis." *Cardiovasc Res* 43(3): 675-684.
- Boden, G., C. Homko, M. Mozzoli, L. C. Showe, C. Nichols y P. Cheung (2005). "Thiazolidinediones upregulate fatty acid uptake and oxidation in adipose tissue of diabetic patients." *Diabetes* 54(3): 880-885.
- Bogdan, C. (2001). "Nitric oxide and the immune response." *Nat Immunol* 2(10): 907-916.
- Bonen, A., S. E. Campbell, C. R. Benton, A. Chabowski, S. L. Coort, X. X. Han, D. P. Koonen, J. F. Glatz y J. J. Luiken (2004). "Regulation of fatty acid transport by fatty acid translocase/CD36." *Proc Nutr Soc* 63(2): 245-249.
- Bordoni, A., M. Di Nunzio, F. Danesi y P. L. Biagi (2006). "Polyunsaturated fatty acids: From diet to binding to ppars and other nuclear receptors." *Genes Nutr* 1(2): 95-106.
- Bougarne, N., R. Paumelle, S. Caron, N. Hennuyer, R. Mansouri, P. Gervois, B. Staels, G. Haegeman y K. De Bosscher (2009). "PPARalpha blocks glucocorticoid receptor alpha-mediated transactivation but cooperates with the activated glucocorticoid receptor alpha for transrepression on NF-kappaB." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(18): 7397-7402.
- Boveris, A., S. F. Llesuy y C. G. Fraga (1985). "Increased liver chemiluminescence in tumor-bearing mice." *J Free Radic Biol Med* 1(2): 131-138.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Braissant, O., F. Foufelle, C. Scotto, M. Dauca y W. Wahli (1996). "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat." *Endocrinology* 137(1): 354-366.
- Braissant, O. y W. Wahli (1998). "Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development." *Endocrinology* 139(6): 2748-2754.

- Brenner, R. R. (2003). "Hormonal modulation of delta6 and delta5 desaturases: case of diabetes." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 68(2): 151-162.
- Brownlee, M. (2005). "The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism." *Diabetes* 54(6): 1615-1625.
- Buchanan, T. A. (2001). "Pancreatic B-cell defects in gestational diabetes: implications for the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes." *J Clin Endocrinol Metab* 86(3): 989-993.
- Buchanan, T. A., A. Xiang, S. L. Kjos y R. Watanabe (2007). "What is gestational diabetes?" *Diabetes Care* 30 Suppl 2: S105-111.
- Burdge, G. C. y K. A. Lillycrop (2014). "Fatty acids and epigenetics." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 17(2): 156-161.
- Burdge, G. C. y P. C. Calder (2015). "Introduction to fatty acids and lipids." *World Rev Nutr Diet* 112: 1-16.
- Buroker, N. E., X. H. Ning y M. Portman (2008). "Cardiac PPARalpha Protein Expression is Constant as Alternate Nuclear Receptors and PGC-1 Coordinately Increase During the Postnatal Metabolic Transition." *PPAR Res* 2008: 279531.
- Canivell, S. y R. Gomis (2014). "Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus." *Autoimmun Rev* 13(4-5): 403-407.
- Cao, Y., Z. Zhao, R. L. Eckert y E. A. Reece (2012). "The essential role of protein kinase Cdelta in diabetes-induced neural tube defects." *J Matern Fetal Neonatal Med* 25(10): 2020-2024.
- Capobianco, E., A. Jawerbaum, M. C. Romanini, V. White, C. Pustovrh, R. Higa, N. Martinez, M. T. Mugnaini, C. Sonez y E. Gonzalez (2005). "15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGamma) levels in term placental tissues from control and diabetic rats: modulatory effects of a PPARgamma agonist on nitridergic and lipid placental metabolism." *Reprod Fertil Dev* 17(4): 423-433.
- Capobianco, E., D. Fornes, N. Martinez, M. B. Mazzucocoy A. Jawerbaum (2012). "Evidencia de programación intrauterina de alteraciones metabólicas en la descendencia de ratas con diabetes moderada." *Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes* 46(4): 235.
- Capobianco, E., M. Pelesson, V. Careaga, D. Fornes, I. Canosa, R. Higa, M. Maier y A. Jawerbaum (2015). "Intrauterine programming of lipid metabolic alterations in the heart of the offspring of diabetic rats is prevented by maternal diets enriched in olive oil." *Mol Nutr Food Res* 59(10): 1997-2007.
- Capobianco, E., N. Martinez, D. Fornes, R. Higa, I. Di Marco, M. N. Basualdo, M. C. Faingold y A. Jawerbaum (2013). "PPAR activation as a regulator of lipid metabolism, nitric oxide production and lipid peroxidation in the placenta from type 2 diabetic patients." *Mol Cell Endocrinol* 377(1-2): 7-15.
- Capobianco, E., N. Martinez, R. Higa, V. White y A. Jawerbaum (2008a). "The effects of maternal dietary treatments with natural PPAR ligands on lipid metabolism in fetuses from control and diabetic rats." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79(6): 191-199.
- Capobianco, E., V. White, M. Sosa, I. Di Marco, M. N. Basualdo, M. C. Faingold y A. Jawerbaum (2012). "Regulation of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Activities by Peroxynitrites in Term Placentas From Type 2 Diabetic Patients." *Reprod Sci.* 19(8):814-22
- Capobianco, E., V. White, R. Higa, N. Martinez y A. Jawerbaum (2008b). "Effects of natural ligands of PPARgamma on lipid metabolism in placental tissues from healthy and diabetic rats." *Mol Hum Reprod* 14(8): 491-499.
- Careaga, V. P., C. Muniain y M. S. Maier (2013). "Fatty acid composition of the edible sea cucumber *Athyonidium chilensis*." *Nat Prod Res* 27(7): 638-646.
- Carey, M. A., J. W. Card, J. W. Voltz, S. J. Arbes, Jr., D. R. Germolec, K. S. Korach y D. C. Zeldin (2007). "It's all about sex: gender, lung development and lung disease." *Trends Endocrinol Metab* 18(8): 308-313.
- Catala, A. (2010). "A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids." *Biochem Biophys Res Commun* 399(3): 318-323.
- Catalano, P. M. (2014). "Trying to understand gestational diabetes." *Diabet Med* 31(3): 273-281.

- Catalano, P. M., A. Thomas, L. Huston-Presley y S. B. Amini (2003). "Increased fetal adiposity: a very sensitive marker of abnormal in utero development." *Am J Obstet Gynecol* 189(6): 1698-1704.
- Cetin, I., Radaelli T. (2005). Normal and abnormal fetal growth. *Diabetology of Pregnancy*. J. Djelmis, Desoye, G.; Ivanisevic, M. Basel, Karger: 72-82.
- Chandra, V., P. Huang, Y. Hamuro, S. Raghuram, Y. Wang, T. P. Burris y F. Rastinejad (2008). "Structure of the intact PPAR-gamma-RXR- nuclear receptor complex on DNA." *Nature* 456(7220): 350-356.
- Chao, A. C., B. I. Ziadah, G. Y. Diau, V. Wijendran, E. Sarkadi-Nagy, A. T. Hsieh, P. W. Nathanielsz y J. T. Brenna (2003). "Influence of dietary long-chain PUFA on premature baboon lung FA and dipalmitoyl PC composition." *Lipids* 38(4): 425-429.
- Chen, H., S. Jackson, M. Doro y S. McGowan (1998). "Perinatal expression of genes that may participate in lipid metabolism by lipid-laden lung fibroblasts." *J Lipid Res* 39(12): 2483-2492.
- Chinetti, G., F. G. Gbaguidi, S. Griglio, Z. Mallat, M. Antonucci, P. Poulain, J. Chapman, J. C. Fruchart, A. Tedgui, J. Najib-Fruchart y B. Staels (2000). "CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors." *Circulation* 101(20): 2411-2417.
- Clarke, S. D., L. Benjamin, L. Bell y S. D. Phinney (1988). "Fetal growth and fetal lung phospholipid content in rats fed safflower oil, menhaden oil, or hydrogenated coconut oil." *Am J Clin Nutr* 47(5): 828-835.
- Clockaerts, S., Y. M. Bastiaansen-Jenniskens, C. Feijt, J. A. Verhaar, J. Somville, L. S. De Clerck y G. J. Van Osch (2011). "Peroxisome proliferator activated receptor alpha activation decreases inflammatory and destructive responses in osteoarthritic cartilage." *Osteoarthritis Cartilage* 19(7): 895-902.
- Collett, G. P., A. M. Betts, M. I. Johnson, A. B. Pulimood, S. Cook, D. E. Neal y C. N. Robson (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha is an androgen-responsive gene in human prostate and is highly expressed in prostatic adenocarcinoma." *Clin Cancer Res* 6(8): 3241-3248.
- Collins, A. R., K. Raslova, M. Somorovska, H. Petrovska, A. Ondrusova, B. Vohnout, R. Fabry y M. Dusinska (1998). "DNA damage in diabetes: correlation with a clinical marker." *Free Radic Biol Med* 25(3): 373-377.
- Correa, A., S. M. Gilboa, L. M. Besser, L. D. Botto, C. A. Moore, C. A. Hobbs, M. A. Cleves, T. J. Riehle-Colarusso, D. K. Waller y E. A. Reece (2008). "Diabetes mellitus and birth defects." *Am J Obstet Gynecol* 199(3): 237 e231-239.
- Corrigan, N., D. P. Brazil y F. McAuliffe (2009). "Fetal cardiac effects of maternal hyperglycemia during pregnancy." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 85(6): 523-530.
- Corzo, C. y P. R. Griffin (2013). "Targeting the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma to Counter the Inflammatory Milieu in Obesity." *Diabetes Metab J* 37(6): 395-403.
- Costa, R. A., C. D. Romagna, J. L. Pereira y N. C. Souza-Pinto (2011). "The role of mitochondrial DNA damage in the cytotoxicity of reactive oxygen species." *J Bioenerg Biomembr* 43(1): 25-29.
- Costet, P., C. Legendre, J. More, A. Edgar, P. Galtier y T. Pineau (1998). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha-isoform deficiency leads to progressive dyslipidemia with sexually dimorphic obesity and steatosis." *J Biol Chem* 273(45): 29577-29585.
- Crisafulli, C., S. Bruscoli, E. Esposito, E. Mazzon, R. Di Paola, T. Genovese, P. Bramanti, G. Migliorati y S. Cuzzocrea (2009). "PPAR-alpha contributes to the anti-inflammatory activity of 17beta-estradiol." *J Pharmacol Exp Ther* 331(3): 796-807.
- Crisafulli, C. y S. Cuzzocrea (2009). "The role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR-alpha) in the regulation of inflammation in macrophages." *Shock* 32(1): 62-73.
- Crosby, M. B., J. Svenson, G. S. Gilkeson y T. K. Nowling (2005). "A novel PPAR response element in the murine iNOS promoter." *Mol Immunol* 42(11): 1303-1310.

- Cunard, R., M. Ricote, D. DiCampli, D. C. Archer, D. A. Kahn, C. K. Glass y C. J. Kelly (2002). "Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors." *J Immunol* 168(6): 2795-2802.
- Cuzzocrea, S. (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptors and acute lung injury." *Curr Opin Pharmacol* 6(3): 263-270.
- Cuzzocrea, S., E. Mazzone, R. Di Paola, A. Peli, A. Bonato, D. Britti, T. Genovese, C. Muia, C. Crisafulli y A. P. Caputi (2006). "The role of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) in the regulation of acute inflammation." *J Leukoc Biol* 79(5): 999-1010.
- De Bosscher, K., W. Vanden Berghe y G. Haegeman (2006). "Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor kappaB." *Oncogene* 25(51): 6868-6886.
- Del Prato, S. (2009). "Role of glucotoxicity and lipotoxicity in the pathophysiology of Type 2 diabetes mellitus and emerging treatment strategies." *Diabet Med* 26(12): 1185-1192.
- Delayre-Orthez, C., J. Becker, J. Auwerx, N. Frossard y F. Pons (2008). "Suppression of allergen-induced airway inflammation and immune response by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist fenofibrate." *Eur J Pharmacol* 581(1-2): 177-184.
- Delerive, P., J. C. Fruchart y B. Staels (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control." *J Endocrinol* 169(3): 453-459.
- Delerive, P., K. De Bosscher, S. Besnard, W. Vanden Berghe, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, J. C. Fruchart, A. Tedgui, G. Haegeman y B. Staels (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1." *J Biol Chem* 274(45): 32048-32054.
- Delerive, P., P. Gervois, J. C. Fruchart y B. Staels (2000). "Induction of IkappaBalpha expression as a mechanism contributing to the anti-inflammatory activities of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activators." *J Biol Chem* 275(47): 36703-36707.
- Dellamea, B. S., C. B. Leitao, R. Friedman y L. H. Canani (2014). "Nitric oxide system and diabetic nephropathy." *Diabetol Metab Syndr* 6(1): 17.
- Demmelair, H. y B. Koletzko (2015). "Importance of fatty acids in the perinatal period." *World Rev Nutr Diet* 112: 31-47.
- Desoye, G. y E. Shafir (1994). "Placental metabolism and its regulation in health and diabetes." *Mol Aspects Med* 15(6): 505-682.
- Desvergne, B., L. Michalik y W. Wahli (2004). "Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road." *Mol Endocrinol* 18(6): 1321-1332.
- Desvergne, B., L. Michalik y W. Wahli (2006). "Transcriptional regulation of metabolism." *Physiol Rev* 86(2): 465-514.
- Devchand, P. R., H. Keller, J. M. Peters, M. Vazquez, F. J. Gonzalez y W. Wahli (1996). "The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control." *Nature* 384(6604): 39-43.
- Dib, S. A. y M. B. Gomes (2009). "Etiopathogenesis of type 1 diabetes mellitus: prognostic factors for the evolution of residual beta cell function." *Diabetol Metab Syndr* 1(1): 25.
- Diradourian, C., J. Girard y J. P. Pegorier (2005). "Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance." *Biochimie* 87(1): 33-38.
- DiRenzo, J., M. Soderstrom, R. Kurokawa, M. H. Ogliastro, M. Ricote, S. Ingrey, A. Horlein, M. G. Rosenfeld y C. K. Glass (1997). "Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators, and corepressors." *Mol Cell Biol* 17(4): 2166-2176.
- Djordjevic, A., S. Spasic, A. Jovanovic-Galovic, R. Djordjevic y G. Grubor-Lajsic (2004). "Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products." *J Matern Fetal Neonatal Med* 16(6): 367-372.
- Djouadi, F., C. J. Weinheimer, J. E. Saffitz, C. Pitchford, J. Bastin, F. J. Gonzalez y D. P. Kelly (1998). "A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-deficient mice." *J Clin Invest* 102(6): 1083-1091.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev* 82(1): 47-95.

- Durnwald, C. y M. Landon (2013). "Fetal links to chronic disease: the role of gestational diabetes mellitus." *Am J Perinatol* 30(5): 343-346.
- El-Sayyad, H. I., M. M. Al-Haggar, H. A. El-Ghawet y I. H. Bakr (2014). "Effect of maternal diabetes and hypercholesterolemia on fetal liver of albino Wistar rats." *Nutrition* 30(3): 326-336.
- Eriksson, U. J. (2009). "Congenital anomalies in diabetic pregnancy." *Semin Fetal Neonatal Med* 14(2): 85-93.
- Eriksson, U. J., J. Cederberg y P. Wentzel (2003). "Congenital malformations in offspring of diabetic mothers--animal and human studies." *Rev Endocr Metab Disord* 4(1): 79-93.
- Evans, M., N. Khan y A. Rees (1999). "Diabetic dyslipidaemia and coronary heart disease: new perspectives." *Curr Opin Lipidol* 10(5): 387-391.
- Farhangkhoe, H., Z. A. Khan, Y. Barbin y S. Chakrabarti (2005). "Glucose-induced up-regulation of CD36 mediates oxidative stress and microvascular endothelial cell dysfunction." *Diabetologia* 48(7): 1401-1410.
- Federación Internacional de Diabetes (2013). *Atlas de la Diabetes de la Federación Internacional de Diabetes*. IDF.
- Feige, J. N., L. Gelman, L. Michalik, B. Desvergne y W. Wahli (2006). "From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions." *Prog Lipid Res* 45(2): 120-159.
- Feige, J. N. y J. Auwerx (2007). "Transcriptional coregulators in the control of energy homeostasis." *Trends Cell Biol* 17(6): 292-301.
- Feng, Q., W. Song, X. Lu, J. A. Hamilton, M. Lei, T. Peng y S. P. Yee (2002). "Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase." *Circulation* 106(7): 873-879.
- Ferriols, E., C. Rueda, R. Gamero, M. Vidal, A. Paya, R. Carreras, J. A. Flores-le Roux y J. Pedro-Botet (2015). "[Relationship between lipids alterations during pregnancy and adverse pregnancy outcomes]." *Clin Investig Arterioscler*.
- Fievet, C. y B. Staels (2009). "Combination therapy of statins and fibrates in the management of cardiovascular risk." *Curr Opin Lipidol* 20(6): 505-511.
- Finck, B. N. (2007). "The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease." *Cardiovasc Res* 73(2): 269-277.
- Finkel, T. (2011). "Signal transduction by reactive oxygen species." *J Cell Biol* 194(1): 7-15.
- Forgiarini, L. A., Jr., N. A. Kretzmann, M. Porawski, A. S. Dias y N. A. Marroni (2009). "Experimental diabetes mellitus: oxidative stress and changes in lung structure." *J Bras Pneumol* 35(8): 788-791.
- Forman, B. M., J. Chen y R. M. Evans (1997). "Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4312-4317.
- Forman, B. M., P. Tontonoz, J. Chen, R. P. Brun, B. M. Spiegelman y R. M. Evans (1995). "15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma." *Cell* 83(5): 803-812.
- Forouhi, N. G. y N. J. Wareham (2014). "Epidemiology of diabetes." *Medicine (Abingdon)* 42(12): 698-702.
- Fournier, T., V. Tsatsaris, K. Handschuh y D. Evain-Brion (2007). "PPARs and the placenta." *Placenta* 28(2-3): 65-76.
- Fowden, A. L. y D. J. Hill (2001). "Intra-uterine programming of the endocrine pancreas." *Br Med Bull* 60: 123-142.
- Fruchart, J.-C., B. Staels y P. Duriez (2003). *Ppar-Alpha in Lipid and Lipoprotein Metabolism, Vascular Inflammation and Atherosclerosis. Atherosclerosis, Hypertension and Diabetes*. G. Pierce, M. Nagano, P. Zahradka and N. Dhalla, Springer US. 8: 3-16.
- Gao, L., W. Huang y J. Li (2013). "NOX1 abet mesangial fibrogenesis via iNOS induction in diabetes." *Mol Cell Biochem* 382(1-2): 185-191.
- Gao, Y. y J. U. Raj (2010). "Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn." *Physiol Rev* 90(4): 1291-1335.

- Garcia-Patterson, A., A. Aulinas, L. Sojo, G. Ginovart, J. M. Adelantado, A. de Leiva y R. Corcoy (2011). "Poorer perinatal outcome in male newborns of women with pregestational diabetes mellitus." *Diabet Med* 28(4): 436-439.
- Gervois, P. y R. M. Mansouri (2012). "PPARalpha as a therapeutic target in inflammation-associated diseases." *Expert Opin Ther Targets* 16(11): 1113-1125.
- Giacco, F. y M. Brownlee (2010). "Oxidative stress and diabetic complications." *Circ Res* 107(9): 1058-1070.
- Gilbert, S. (2006). *Biología del desarrollo*, Ed. Panamericana.
- Gil-Sanchez, A., B. Koletzko y E. Larque (2012). "Current understanding of placental fatty acid transport." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 15(3): 265-272.
- Gitto, E., R. J. Reiter, M. Karbownik, D. X. Tan, P. Gitto, S. Barberi y I. Barberi (2002). "Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period." *Biol Neonate* 81(3): 146-157.
- Glass, C. K. y K. Saijo (2010). "Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells." *Nat Rev Immunol* 10(5): 365-376.
- Goldman, M. D. (2003). "Lung dysfunction in diabetes." *Diabetes Care* 26(6): 1915-1918.
- Gray, E., M. Ginty, K. Kemp, N. Scolding y A. Wilkins (2011). "Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonists protect cortical neurons from inflammatory mediators and improve peroxisomal function." *Eur J Neurosci* 33(8): 1421-1432.
- Gregoire, F. M., F. Zhang, H. J. Clarke, T. A. Gustafson, D. D. Sears, S. Favelyukis, J. Lenhard, D. Rentzeperis, L. E. Clemens, Y. Mu y B. E. Lavan (2009). "MBX-102/JNJ39659100, a novel peroxisome proliferator-activated receptor-ligand with weak transactivation activity retains antidiabetic properties in the absence of weight gain and edema." *Mol Endocrinol* 23(7): 975-988.
- Grissa, O., J. M. Ategbro, A. Yessoufou, Z. Tabka, A. Miled, M. Jerbi, K. L. Dramane, K. Moutairou, J. Prost, A. Hichami y N. A. Khan (2007). "Antioxidant status and circulating lipids are altered in human gestational diabetes and macrosomia." *Transl Res* 150(3): 164-171.
- Gruppuso, P. A., J. M. Boylan y C. A. Vaslet (2000). "Identification of candidate growth-regulating genes that are overexpressed in late gestation fetal liver in the rat." *Biochim Biophys Acta* 1494(3): 242-247.
- Grygiel-Gorniak, B. (2014). "Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review." *Nutr J* 13: 17.
- Guermouche, B., N. A. Soulimane-Mokhtari, S. Bouanane, H. Merzouk, S. Merzouk y M. Narce (2014). "Effect of dietary n - 3 polyunsaturated fatty acids on oxidant/antioxidant status in macrosomic offspring of diabetic rats." *Biomed Res Int* 2014: 368107.
- Gumieniczek, A., H. Hopkala, Z. Wojtowicz y M. Wysocka (2002). "Changes in antioxidant status of lung tissue in experimental diabetes in rabbits." *Clin Biochem* 35(2): 147-149.
- Gurr, W., R. Yavari, L. Wen, M. Shaw, C. Mora, L. Christa y R. S. Sherwin (2002). "A Reg family protein is overexpressed in islets from a patient with new-onset type 1 diabetes and acts as T-cell autoantigen in NOD mice." *Diabetes* 51(2): 339-346.
- Haffner, S. M., A. S. Greenberg, W. M. Weston, H. Chen, K. Williams y M. I. Freed (2002). "Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus." *Circulation* 106(6): 679-684.
- Haggarty, P. (2010). "Fatty acid supply to the human fetus." *Annu Rev Nutr* 30: 237-255.
- Hall, S. M., A. A. Hislop, C. M. Pierce y S. G. Haworth (2000). "Prenatal origins of human intrapulmonary arteries: formation and smooth muscle maturation." *Am J Respir Cell Mol Biol* 23(2): 194-203.
- Halliwell, B. y O. I. Aruoma (1991). "DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems." *FEBS Lett* 281(1-2): 9-19.
- Halliwell y Gutteridge (2007). *Free radicals in biology and medicine*.
- Hannon, T. S., G. Rao y S. A. Arslanian (2005). "Childhood obesity and type 2 diabetes mellitus." *Pediatrics* 116(2): 473-480.
- Harmon, G. S., M. T. Lam y C. K. Glass (2011). "PPARs and lipid ligands in inflammation and metabolism." *Chem Rev* 111(10): 6321-6340.

- Hashimoto, F., Y. Oguchi, M. Morita, K. Matsuoka, S. Takeda, M. Kimura y H. Hayashi (2004). "PPARalpha agonists clofibrate and gemfibrozil inhibit cell growth, down-regulate hCG and up-regulate progesterone secretions in immortalized human trophoblast cells." *Biochem Pharmacol* 68(2): 313-321.
- Hausel, P., H. Latado, F. Courjault-Gautier y E. Felley-Bosco (2006). "Src-mediated phosphorylation regulates subcellular distribution and activity of human inducible nitric oxide synthase." *Oncogene* 25(2): 198-206.
- Hauser, S., G. Adelmant, P. Sarraf, H. M. Wright, E. Mueller y B. M. Spiegelman (2000). "Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation." *J Biol Chem* 275(24): 18527-18533.
- Hecker, M., A. Behnk, R. E. Morty, N. Sommer, I. Vadasz, S. Herold, W. Seeger y K. Mayer (2015). "PPAR-alpha activation reduced LPS-induced inflammation in alveolar epithelial cells." *Exp Lung Res* 41(7): 393-403.
- Heikkinen, S., J. Auwerx y C. A. Argmann (2007). "PPARgamma in human and mouse physiology." *Biochim Biophys Acta* 1771(8): 999-1013.
- Herrera, E., E. Amusquivar, I. Lopez-Soldado y H. Ortega (2006). "Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer." *Horm Res* 65 Suppl 3: 59-64.
- Herrera, E., M. Palacin, A. Martin y M. A. Lasuncion (1985). "Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity." *Diabetes* 34 Suppl 2: 42-46.
- Herrera, E. y H. Ortega-Senovilla (2010). "Disturbances in lipid metabolism in diabetic pregnancy - Are these the cause of the problem?" *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24(4): 515-525.
- Herrera, E. y H. Ortega-Senovilla (2014). "Lipid metabolism during pregnancy and its implications for fetal growth." *Curr Pharm Biotechnol* 15(1): 24-31.
- Higa, R., E. Gonzalez, M. C. Pustovrh, V. White, E. Capobianco, N. Martinez y A. Jawerbaum (2007). "PPARdelta and its activator PGI2 are reduced in diabetic embryopathy: involvement of PPARdelta activation in lipid metabolic and signalling pathways in rat embryo early organogenesis." *Mol Hum Reprod* 13(2): 103-110.
- Higa, R., M. Kurtz, E. Capobianco, N. Martinez, V. White y A. Jawerbaum (2011). "Altered matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in embryos from diabetic rats during early organogenesis." *Reproductive Toxicology* In press.
- Higa, R., M. Kurtz, M. B. Mazzucco, D. Musikant, V. White y A. Jawerbaum (2012). "Folic acid and safflower oil supplementation interacts and protects embryos from maternal diabetes-induced damage." *Mol Hum Reprod* 18(5): 253-264.
- Higa, R., S. L. Roberti, D. Musikant, M. B. Mazzucco, V. White y A. Jawerbaum (2014). "Effects of maternal dietary olive oil on pathways involved in diabetic embryopathy." *Reprod Toxicol* 49: 185-195.
- Higa, R., V. White, N. Martinez, M. Kurtz, E. Capobianco y A. Jawerbaum (2010). "Safflower and olive oil dietary treatments rescue aberrant embryonic arachidonic acid and nitric oxide metabolism and prevent diabetic embryopathy in rats." *Mol Hum Reprod* 16(4): 286-295.
- Higa, R. y A. Jawerbaum (2013). "Intrauterine effects of impaired lipid homeostasis in pregnancy diseases." *Curr Med Chem* 20(18): 2338-2350.
- Hihi, A. K., L. Michalik y W. Wahli (2002). "PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives." *Cell Mol Life Sci* 59(5): 790-798.
- Hislop, A. (2005). "Developmental biology of the pulmonary circulation." *Paediatr Respir Rev* 6(1): 35-43.
- Hollenberg, S. M. y I. Cinel (2009). "Bench-to-bedside review: nitric oxide in critical illness--update 2008." *Crit Care* 13(4): 218.
- Hostetler, H. A., A. D. Petrescu, A. B. Kier y F. Schroeder (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands." *J Biol Chem* 280(19): 18667-18682.

- Huang, T. H., V. Razmovski-Naumovski, B. P. Kota, D. S. Lin y B. D. Roufogalis (2005). "The pathophysiological function of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in lung-related diseases." *Respir Res* 6: 102.
- Innis, S. M. (2007). "Dietary (n-3) fatty acids and brain development." *J Nutr* 137(4): 855-859.
- Inoue, I., S. Noji, M. Z. Shen, K. Takahashi y S. Katayama (1997). "The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) regulates the plasma thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) level." *Biochem Biophys Res Commun* 237(3): 606-610.
- Inoue, I., S. Noji, T. Awata, K. Takahashi, T. Nakajima, M. Sonoda, T. Komoda y S. Katayama (1998). "Bezafibrate has an antioxidant effect: peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase in the liver." *Life Sci* 63(2): 135-144.
- Jansson, T., I. Cetin, T. L. Powell, G. Desoye, T. Radaelli, A. Ericsson y C. P. Sibley (2006). "Placental transport and metabolism in fetal overgrowth -- a workshop report." *Placenta* 27 Suppl A: S109-113.
- Jawerbaum, A., D. Sinner, V. White, C. Pustovrh, E. Capobianco, M. A. Gimeno y E. T. Gonzalez (2001). "Modulation of PGE₂ generation in the diabetic embryo: effect of nitric oxide and superoxide dismutase." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 64(2): 127-133.
- Jawerbaum, A., D. Sinner, V. White, C. Pustovrh, E. Capobianco y E. Gonzalez (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(5): 625-631.
- Jawerbaum, A., E. Capobianco, C. Pustovrh, V. White, M. Baier, S. Salzberg, M. Pesaresi y E. Gonzalez (2004). "Influence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation by its endogenous ligand 15-deoxy Delta^{12,14} prostaglandin J₂ on nitric oxide production in term placental tissues from diabetic women." *Mol Hum Reprod* 10(9): 671-676.
- Jawerbaum, A., E. T. Gonzalez, V. Novaro, A. Faletti, D. Sinner y M. A. Gimeno (1998). "Increased prostaglandin E generation and enhanced nitric oxide synthase activity in the non-insulin-dependent diabetic embryo during organogenesis." *Reprod Fertil Dev* 10(2): 191-196.
- Jawerbaum, A., R. Higa, V. White, E. Capobianco, C. Pustovrh, D. Sinner, N. Martinez y E. Gonzalez (2005). "Peroxyntrites and impaired modulation of nitric oxide concentrations in embryos from diabetic rats during early organogenesis." *Reproduction* 130(5): 695-703.
- Jawerbaum, A. y E. Capobianco (2011). "Review: Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: implications in maternal diabetes." *Placenta* 32 Suppl 2: S212-217.
- Jawerbaum, A. y E. Gonzalez (2005). "The role of alterations in arachidonic acid metabolism and nitric oxide homeostasis in rat models of diabetes during early pregnancy." *Curr Pharm Des* 11(10): 1327-1342.
- Jawerbaum, A. y E. Gonzalez (2006). "Diabetic pregnancies: the challenge of developing in a pro-inflammatory environment." *Curr Med Chem* 13(18): 2127-2138.
- Jawerbaum, A. y V. White (2010). "Animal models in diabetes and pregnancy." *Endocr Rev* 31(5): 680-701.
- Jiang, C., A. T. Ting y B. Seed (1998). "PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." *Nature* 391(6662): 82-86.
- Johansen, J. S., A. K. Harris, D. J. Rychly y A. Ergul (2005). "Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice." *Cardiovasc Diabetol* 4: 5.
- Jones, D. C., X. Ding y R. A. Daynes (2002). "Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) is expressed in resting murine lymphocytes. The PPARalpha in T and B lymphocytes is both transactivation and transrepression competent." *J Biol Chem* 277(9): 6838-6845.
- Joshi, S. y S. Kotecha (2007). "Lung growth and development." *Early Hum Dev* 83(12): 789-794.
- Joss-Moore, L. A., Y. Wang, M. L. Baack, J. Yao, A. W. Norris, X. Yu, C. W. Callaway, R. A. McKnight, K. H. Albertine y R. H. Lane (2010). "IUGR decreases PPARgamma and SETD8 Expression

- in neonatal rat lung and these effects are ameliorated by maternal DHA supplementation." *Early Hum Dev* 86(12): 785-791.
- Junod, A., A. E. Lambert, W. Stauffacher y A. E. Renold (1969). "Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response." *J Clin Invest* 48(11): 2129-2139.
- Kardong, K. (2007). *Vertebrados. Anatomía comparada, función y evolución*, Mc Graw Hill.
- Kautzky-Willer, A. y A. Handisurya (2009). "Metabolic diseases and associated complications: sex and gender matter!" *Eur J Clin Invest* 39(8): 631-648.
- Kayama, Y., U. Raaz, A. Jagger, M. Adam, I. N. Schellinger, M. Sakamoto, H. Suzuki, K. Toyama, J. M. Spin y P. S. Tsao (2015). "Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress." *Int J Mol Sci* 16(10): 25234-25263.
- Keilhoff, G., B. Seidel, H. Noack, W. Tischmeyer, D. Stanek y G. Wolf (1996). "Patterns of nitric oxide synthase at the messenger RNA and protein levels during early rat brain development." *Neuroscience* 75(4): 1193-1201.
- Khan, A. H., R. J. Carson y S. M. Nelson (2008). "Prostaglandins in labor--a translational approach." *Front Biosci* 13: 5794-5809.
- Kinalski, M., A. Sledziewski, B. Telejko, W. Zarzycki y I. Kinalska (2000). "Lipid peroxidation and scavenging enzyme activity in streptozotocin-induced diabetes." *Acta Diabetol* 37(4): 179-183.
- Kiss, A. C., P. H. Lima, Y. K. Sinzato, M. Takaku, M. A. Takeno, M. V. Rudge y D. C. Damasceno (2009). "Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes." *Diabetol Metab Syndr* 1(1): 21.
- Kitzmler, J. L., R. Wallerstein, A. Correa y S. Kwan (2010). "Preconception care for women with diabetes and prevention of major congenital malformations." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88(10): 791-803.
- Kong, Y., M. Grimaldi, E. Curtin, M. Dougherty, C. Kaufman, R. M. White, L. I. Zon y E. C. Liao (2014). "Neural crest development and craniofacial morphogenesis is coordinated by nitric oxide and histone acetylation." *Chem Biol* 21(4): 488-501.
- Korotkova, M., B. G. Gabrielsson, A. Holmang, B. M. Larsson, L. A. Hanson y B. Strandvik (2005). "Gender-related long-term effects in adult rats by perinatal dietary ratio of n-6/n-3 fatty acids." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(3): R575-579.
- Koskinen, A., H. Lukkarinen, N. Moritz, H. Aho, P. Kaapay H. Soukka (2012). "Fetal hyperglycemia alters lung structural development in neonatal rat." *Pediatr Pulmonol* 47(3): 275-282.
- Kowluru, R. A., M. Kanwar y A. Kennedy (2007). "Metabolic memory phenomenon and accumulation of peroxynitrite in retinal capillaries." *Exp Diabetes Res* 2007: 21976.
- Krause, B. J., M. A. Hanson y P. Casanello (2011). "Role of nitric oxide in placental vascular development and function." *Placenta* 32(11): 797-805.
- Kulandavelu, S., K. J. Whiteley, S. A. Bainbridge, D. Qu y S. L. Adamson (2013). "Endothelial NO synthase augments fetoplacental blood flow, placental vascularization, and fetal growth in mice." *Hypertension* 61(1): 259-266.
- Lain, K. Y. y P. M. Catalano (2007). "Metabolic changes in pregnancy." *Clin Obstet Gynecol* 50(4): 938-948.
- Lane, D. M., W. J. McConathy, M. A. McCaffree y M. Hall (2002). "Cord serum lipid and apolipoprotein levels in preterm infants with the neonatal respiratory distress syndrome." *J Matern Fetal Neonatal Med* 11(2): 118-125.
- Langman, J. y T. W. Sadler (2011). *Langman. Fundamentos de Embriología Médica*, Panamericana.
- Lapertosa, S., J. Alvariñas, S. Salzberg y M. C. Faingold (2014). "Diabetes y Embarazo." *Rev Soc Arg Diab* 48(1): 1-4.
- Lappas, M., M. Permezel, H. M. Georgiou y G. E. Rice (2002). "Regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-PGJ(2) and troglitazone." *J Clin Endocrinol Metab* 87(10): 4667-4672.

- Lappas, M., M. Permezel y G. E. Rice (2006). "15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) and troglitazone regulation of the release of phospholipid metabolites, inflammatory cytokines and proteases from human gestational tissues." *Placenta* 27(11-12): 1060-1072.
- Lappas, M., U. Hiden, G. Desoye, J. Froehlich, S. H. Mouzon y A. Jawerbaum (2011). "The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus." *Antioxid Redox Signal* 15(12): 3061-3100.
- Lawrence, S., J. Warshaw y H. C. Nielsen (1989). "Delayed lung maturation in the macrosomic offspring of genetically determined diabetic (db/+) mice." *Pediatr Res* 25(2): 173-179.
- Leach, L., A. Taylor y F. Sciota (2009). "Vascular dysfunction in the diabetic placenta: causes and consequences." *J Anat* 215(1): 69-76.
- Lee, J. E. y K. Ge (2014). "Transcriptional and epigenetic regulation of PPARgamma expression during adipogenesis." *Cell Biosci* 4: 29.
- Lee, J., H. Ryu, R. J. Ferrante, S. M. Morris, Jr. y R. R. Ratan (2003). "Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8): 4843-4848.
- Lee, T. C., Y. D. Zhao, D. W. Courtman y D. J. Stewart (2000). "Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase." *Circulation* 101(20): 2345-2348.
- Lee, T. I., Y. H. Kao, Y. C. Chen, J. H. Huang, F. C. Hsiao y Y. J. Chen (2013). "Peroxisome proliferator-activated receptors modulate cardiac dysfunction in diabetic cardiomyopathy." *Diabetes Res Clin Pract* 100(3): 330-339.
- Lee, W. S. y J. Kim (2015). "Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and the Heart: Lessons from the Past and Future Directions." *PPAR Res* 2015: 271983.
- Lefebvre, P., G. Chinetti, J. C. Fruchart y B. Staels (2006). "Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis." *J Clin Invest* 116(3): 571-580.
- Lehninger (2014). D.L Nelson y M.M Cox *Principios de Bioquímica*. Editorial Omega 6ta Edición.
- Leone, T. C., C. J. Weinheimer y D. P. Kelly (1999). "A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13): 7473-7478.
- Li, Y., D. Liu, Y. Liu, E. Li, H. Wang, K. Liu y J. Qi (2013). "Protein nitration promotes inducible nitric oxide synthase transcription mediated by NF-kappaB in high glucose-stimulated human lens epithelial cells." *Mol Cell Endocrinol* 370(1-2): 78-86.
- Li, Z., J. D. Otvos, S. Lamon-Fava, W. V. Carrasco, A. H. Lichtenstein, J. R. McNamara, J. M. Ordovas y E. J. Schaefer (2003). "Men and women differ in lipoprotein response to dietary saturated fat and cholesterol restriction." *J Nutr* 133(11): 3428-3433.
- Li, Z., T. Zhang, H. Dai, G. Liu, H. Wang, Y. Sun, Y. Zhang y Z. Ge (2007). "Involvement of endoplasmic reticulum stress in myocardial apoptosis of streptozocin-induced diabetic rats." *J Clin Biochem Nutr* 41(1): 58-67.
- Lin, Q., S. E. Ruuska, N. S. Shaw, D. Dong y N. Noy (1999). "Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha." *Biochemistry* 38(1): 185-190.
- Lin, X., S. Jacobi y J. Odle (2015). "Transplacental induction of fatty acid oxidation in term fetal pigs by the peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist clofibrate." *J Anim Sci Biotechnol* 6(1): 11.
- Lindgaard, M. L. y L. B. Nielsen (2008). "Maternal diabetes causes coordinated down-regulation of genes involved with lipid metabolism in the murine fetal heart." *Metabolism* 57(6): 766-773.
- Ling, S., J. Zhou, J. A. Rudd, Z. Hu y M. Fang (2012). "The expression of neuronal nitric oxide synthase in the brain of the mouse during embryogenesis." *Anat Rec (Hoboken)* 295(3): 504-514.
- Liu, D., Z. Geng, W. Zhu, H. Wang, Y. Chen y J. Liang (2014). "15-deoxy-Delta(1)(2),(1)(4)-prostaglandin J(2) ameliorates endotoxin-induced acute lung injury in rats." *Chin Med J (Engl)* 127(5): 815-820.
- Liu, Y., X. Lu, F. L. Xiang, M. Lu y Q. Feng (2013). "Nitric oxide synthase-3 promotes embryonic development of atrioventricular valves." *PLoS One* 8(10): e77611.

- Lock, M., E. V. McGillick, S. Orgeig, I. C. McMillen y J. L. Morrison (2013). "Regulation of fetal lung development in response to maternal overnutrition." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 40(11): 803-816.
- Loeken, M. R. (2005). "Current perspectives on the causes of neural tube defects resulting from diabetic pregnancy." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 135(1): 77-87.
- Lopez-Alarcon, C., A. Arenas, E. Lissi y E. Silva (2014). "The role of protein-derived free radicals as intermediaries of oxidative processes." *Biomol Concepts* 5(2): 119-130.
- Lopez-Tinoco, C., M. Roca, A. Garcia-Valero, M. Murri, F. J. Tinahones, C. Segundo, J. L. Bartha y M. Aguilar-Diosdado (2013). "Oxidative stress and antioxidant status in patients with late-onset gestational diabetes mellitus." *Acta Diabetol* 50(2): 201-208.
- Lorenzo, O., B. Picatoste, S. Ares-Carrasco, E. Ramirez, J. Egido y J. Tunon (2011). "Potential role of nuclear factor kappaB in diabetic cardiomyopathy." *Mediators Inflamm* 2011: 652097.
- Low, S. Y. y K. R. Bruckdorfer (2004). "Nitric oxide signaling in platelets." *Methods Mol Biol* 273: 313-334.
- Maeda, N., M. Takahashi, T. Funahashi, S. Kihara, H. Nishizawa, K. Kishida, H. Nagaretani, M. Matsuda, R. Komuro, N. Ouchi, H. Kuriyama, K. Hotta, T. Nakamura, I. Shimomura y Y. Matsuzawa (2001). "PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein." *Diabetes* 50(9): 2094-2099.
- Makni, M., M. Sefi, M. Garoui el, H. Fetoui, T. Boudawara y N. Zeghal (2011). "Dietary polyunsaturated fatty acid prevents hyperlipidemia and hepatic oxidant status in pregnant diabetic rats and their macrosomic offspring." *J Diabetes Complications* 25(4): 267-274.
- Mandard, S., M. Muller y S. Kersten (2004). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes." *Cell Mol Life Sci* 61(4): 393-416.
- Mansour, M. (2014). "The roles of peroxisome proliferator-activated receptors in the metabolic syndrome." *Prog Mol Biol Transl Sci* 121: 217-266.
- Marcela, S. G., R. M. Cristina, P. G. Angel, A. M. Manuel, D. C. Sofia, L. R. Patricia de, R. R. Bladimir y S. G. Concepcion (2012). "Chronological and morphological study of heart development in the rat." *Anat Rec (Hoboken)* 295(8): 1267-1290.
- Martinez, N., E. Capobianco, V. White, M. C. Pustovrh, R. Higa y A. Jawerbaum (2008). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation regulates lipid metabolism in the feto-placental unit from diabetic rats." *Reproduction* 136(1): 95-103.
- Martinez, N., M. Kurtz, E. Capobianco, R. Higa, V. White y A. Jawerbaum (2011a). "PPARalpha agonists regulate lipid metabolism and nitric oxide production and prevent placental overgrowth in term placentas from diabetic rats." *J Mol Endocrinol* 47(1): 1-12.
- Martinez, N., M. Sosa, R. Higa, D. Fornes, E. Capobianco y A. Jawerbaum (2012). "Dietary treatments enriched in olive and safflower oils regulate seric and placental matrix metalloproteinases in maternal diabetes." *Placenta* 33(1): 8-16.
- Martinez, N., V. White, M. Kurtz, R. Higa, E. Capobianco y A. Jawerbaum (2011). "Activation of the nuclear receptor PPARalpha regulates lipid metabolism in foetal liver from diabetic rats: implications in diabetes-induced foetal overgrowth." *Diabetes Metab Res Rev* 27(1): 35-46.
- Mascaro, C., E. Acosta, J. A. Ortiz, P. F. Marrero, F. G. Hegardt y D. Haro (1998). "Control of human muscle-type carnitine palmitoyltransferase I gene transcription by peroxisome proliferator-activated receptor." *J Biol Chem* 273(15): 8560-8563.
- McCance, D. R. (2015). "Diabetes in pregnancy." *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 29(5): 685-699.
- Mendez, M. y M. C. LaPointe (2003). "PPARgamma inhibition of cyclooxygenase-2, PGE2 synthase, and inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes." *Hypertension* 42(4): 844-850.
- Menezes, H. S., M. Barra, A. R. Bello, C. B. Martins y P. Zielinsky (2001). "Fetal myocardial hypertrophy in an experimental model of gestational diabetes." *Cardiol Young* 11(6): 609-613.

- Mennitti, L. V., J. L. Oliveira, C. A. Morais, D. Estadella, L. M. Oyama, C. M. Oller do Nascimento y L. P. Pisani (2015). "Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring." *J Nutr Biochem* 26(2): 99-111.
- Milla, C. E. y J. Zirbes (2012). "Pulmonary complications of endocrine and metabolic disorders." *Paediatr Respir Rev* 13(1): 23-28.
- Min, Y., C. Lowy, K. Ghebremeskel, B. Thomas, B. Offley-Shore y M. Crawford (2005). "Unfavorable effect of type 1 and type 2 diabetes on maternal and fetal essential fatty acid status: a potential marker of fetal insulin resistance." *Am J Clin Nutr* 82(6): 1162-1168.
- Mitanchez, D. (2010). "Foetal and neonatal complications in gestational diabetes: perinatal mortality, congenital malformations, macrosomia, shoulder dystocia, birth injuries, neonatal complications." *Diabetes Metab* 36(6 Pt 2): 617-627.
- Mitanchez, D., A. Burguet y U. Simeoni (2014a). "Infants born to mothers with gestational diabetes mellitus: mild neonatal effects, a long-term threat to global health." *J Pediatr* 164(3): 445-450.
- Mitanchez, D., C. Zydorczyk, B. Siddeek, F. Boubred, M. Benahmed y U. Simeoni (2015). "The offspring of the diabetic mother - Short- and long-term implications." *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*.29(2):256-69
- Moazzen, H., X. Lu, M. Liu y Q. Feng (2015). "Pregestational Diabetes Induces Fetal Coronary Artery Malformation via Reactive Oxygen Species Signaling." *Diabetes*. 64(4):1431-43
- Molin, D. G., P. A. Roest, H. Nordstrand, L. J. Wisse, R. E. Poelmann, U. J. Eriksson y A. C. Gittenberger-De Groot (2004). "Disturbed morphogenesis of cardiac outflow tract and increased rate of aortic arch anomalies in the offspring of diabetic rats." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 70(12): 927-938.
- Monroy, M. A., K. K. Opperman, M. Pucciarelli, S. Yerrum, D. A. Berg y J. M. Daly (2007). "THE PPARgamma ligand 15d-PGJ2 modulates macrophage activation after injury in a murine trauma model." *Shock* 28(2): 186-191.
- Morgan, S. C., F. Relaix, L. L. Sandell y M. R. Loeken (2008). "Oxidative stress during diabetic pregnancy disrupts cardiac neural crest migration and causes outflow tract defects." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 82(6): 453-463.
- Morise, A., C. Thomas, J. F. Landrier, P. Besnard y D. Hermier (2009). "Hepatic lipid metabolism response to dietary fatty acids is differently modulated by PPARalpha in male and female mice." *Eur J Nutr* 48(8): 465-473.
- Motojima, K., P. Passilly, J. M. Peters, F. J. Gonzalez y N. Latruffe (1998). "Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner." *J Biol Chem* 273(27): 16710-16714.
- Moya, F. (2014). "Preterm nutrition and the lung." *World Rev Nutr Diet* 110: 239-252.
- Mungrue, I. N., R. Gros, X. You, A. Pirani, A. Azad, T. Csont, R. Schulz, J. Butany, D. J. Stewart y M. Husain (2002). "Cardiomyocyte overexpression of iNOS in mice results in peroxynitrite generation, heart block, and sudden death." *J Clin Invest* 109(6): 735-743.
- Muoio, D. M., P. S. MacLean, D. B. Lang, S. Li, J. A. Houmard, J. M. Way, D. A. Winegar, J. C. Corton, G. L. Dohm y W. E. Kraus (2002). "Fatty acid homeostasis and induction of lipid regulatory genes in skeletal muscles of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha knock-out mice. Evidence for compensatory regulation by PPAR delta." *J Biol Chem* 277(29): 26089-26097.
- Myatt, L. (2010). "Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta." *Placenta* 31 Suppl: S66-69.
- Myatt, L. y X. Cui (2004). "Oxidative stress in the placenta." *Histochem Cell Biol* 122(4): 369-382.
- Narala, V. R., R. K. Adapala, M. V. Suresh, T. G. Brock, M. Peters-Golden y R. C. Reddy (2010). "Leukotriene B4 is a physiologically relevant endogenous peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist." *J Biol Chem* 285(29): 22067-22074.
- National Institutes of Health. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* US National Institutes of Health (NIH Publication, 8th Edition, 2011). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/?report=reader>

- Neerhof, M. G., S. Synowiec, S. Khan y L. G. Thaete (2011). "Pathophysiology of chronic nitric oxide synthase inhibition-induced fetal growth restriction in the rat." *Hypertens Pregnancy* 30(1): 28-36.
- Nguyen, A. T. y R. P. Donaldson (2005). "Metal-catalyzed oxidation induces carbonylation of peroxisomal proteins and loss of enzymatic activities." *Arch Biochem Biophys* 439(1): 25-31.
- Ohshima, T., H. Koga y K. Shimotohno (2004). "Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification." *J Biol Chem* 279(28): 29551-29557.
- Okuno, T., T. Yokomizo, T. Hori, M. Miyano y T. Shimizu (2005). "Leukotriene B4 receptor and the function of its helix 8." *J Biol Chem* 280(37): 32049-32052.
- Oldstone, M. B. (1998). "Molecular mimicry and immune-mediated diseases." *FASEB J* 12(13): 1255-1265.
- Oosthuyse, T. y A. N. Bosch (2012). "Oestrogen's regulation of fat metabolism during exercise and gender specific effects." *Curr Opin Pharmacol* 12(3): 363-371.
- Ornoy, A. (2007). "Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy." *Reprod Toxicol* 24(1): 31-41.
- Ornoy, A. (2011). "Prenatal origin of obesity and their complications: Gestational diabetes, maternal overweight and the paradoxical effects of fetal growth restriction and macrosomia." *Reprod Toxicol* 32(2): 205-212.
- Ornoy, A., E. A. Reece, G. Pavlinkova, C. Kappen y R. K. Miller (2015). "Effect of maternal diabetes on the embryo, fetus, and children: congenital anomalies, genetic and epigenetic changes and developmental outcomes." *Birth Defects Res C Embryo Today* 105(1): 53-72.
- Ortega-Camarillo, C., A. M. Guzman-Grenfell, R. Garcia-Macedo, A. M. Rosales-Torres, A. Avalos-Rodriguez, G. Duran-Reyes, R. Medina-Navarro, M. Cruz, M. Diaz-Flores y J. Kumate (2006). "Hyperglycemia induces apoptosis and p53 mobilization to mitochondria in RINm5F cells." *Mol Cell Biochem* 281(1-2): 163-171.
- Ortega-Senovilla, H., G. Alvino, E. Taricco, I. Cetin y E. Herrera (2009). "Gestational Diabetes Mellitus Impairs the Proportion of Fatty Acids in Umbilical Artery but not in Umbilical Vein Plasma." *Diabetes Care*. 32(1):120-2
- Oztay, F., A. Kandil, E. Gurel, S. Ustunova, A. Kapucu, H. Balci, K. Akgun-Dar y C. Demirci (2008). "The relationship between nitric oxide and leptin in the lung of rat with streptozotocin-induced diabetes." *Cell Biochem Funct* 26(2): 162-171.
- Pacher, P., J. S. Beckman y L. Liaudet (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." *Physiol Rev* 87(1): 315-424.
- Palkar, P. S., C. R. Anderson, C. H. Ferry, F. J. Gonzalez y J. M. Peters (2010). "Effect of prenatal peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonism on postnatal development." *Toxicology* 276(1): 79-84.
- Palm, M., O. Axelsson, L. Wernroth y S. Basu (2009). "F(2)-isoprostanes, tocopherols and normal pregnancy." *Free Radic Res* 43(6): 546-552.
- Palmer, C. N., M. H. Hsu, H. J. Griffin y E. F. Johnson (1995). "Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling." *J Biol Chem* 270(27): 16114-16121.
- Palomer, X., L. Salvado, E. Barroso y M. Vazquez-Carrera (2013). "An overview of the crosstalk between inflammatory processes and metabolic dysregulation during diabetic cardiomyopathy." *Int J Cardiol* 168(4): 3160-3172.
- Pascual, G., A. L. Fong, S. Ogawa, A. Gamliel, A. C. Li, V. Perissi, D. W. Rose, T. M. Willson, M. G. Rosenfeld y C. K. Glass (2005). "A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma." *Nature* 437(7059): 759-763.
- Passarella, G., G. Trifiro, M. Gasparetto, G. S. Moreolo y O. Milanesi (2013). "Disorders in glucidic metabolism and congenital heart diseases: detection and prevention." *Pediatr Cardiol* 34(4): 931-937.

- Paukkeri, E. L., T. Leppanen, O. Sareila, K. Vuolteenaho, H. Kankaanranta y E. Moilanen (2007). "PPARalpha agonists inhibit nitric oxide production by enhancing iNOS degradation in LPS-treated macrophages." *Br J Pharmacol* 152(7): 1081-1091.
- Pauliks, L. B. (2015). "The effect of pregestational diabetes on fetal heart function." *Expert Rev Cardiovasc Ther* 13(1): 67-74.
- Pereira, A. C. y F. Martel (2014). "Oxidative stress in pregnancy and fertility pathologies." *Cell Biol Toxicol* 30(5): 301-312.
- Piper, J. M. (2002). "Lung maturation in diabetes in pregnancy: if and when to test." *Semin Perinatol* 26(3): 206-209.
- Pisoschi, A. M. y A. Pop (2015). "The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review." *Eur J Med Chem* 97: 55-74.
- Plachta, N., A. Traister y M. Weil (2003). "Nitric oxide is involved in establishing the balance between cell cycle progression and cell death in the developing neural tube." *Exp Cell Res* 288(2): 354-362.
- Poniedzialek-Czajkowska, E., R. Mierzynski, Z. Kimber-Trojnar, B. Leszczynska-Gorzela y J. Oleszczuk (2014). "Polyunsaturated fatty acids in pregnancy and metabolic syndrome: a review." *Curr Pharm Biotechnol* 15(1): 84-99.
- Portha, B., L. Picon y G. Rosselin (1979). "Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes." *Diabetologia* 17(6): 371-377.
- Pringle, K. C. (1986). "Human fetal lung development and related animal models." *Clin Obstet Gynecol* 29(3): 502-513.
- Pustovrh, M. C., A. Jawerbaum, E. Capobianco, V. White, J. J. Lopez-Costa y E. Gonzalez (2005a). "Increased matrix metalloproteinases 2 and 9 in placenta of diabetic rats at midgestation." *Placenta* 26(4): 339-348.
- Pustovrh, M. C., A. Jawerbaum, E. Capobianco, V. White, N. Martinez, J. J. Lopez-Costa y E. Gonzalez (2005b). "Oxidative stress promotes the increase of matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in the feto-placental unit of diabetic rats." *Free Radic Res* 39(12): 1285-1293.
- Pustovrh, M. C., A. Jawerbaum, V. White, E. Capobianco, R. Higa, N. Martinez, J. J. Lopez-Costa y E. Gonzalez (2007). "The role of nitric oxide on matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 in placenta and fetus from diabetic rats." *Reproduction* 134(4): 605-613.
- Pustovrh, M. C., E. Capobianco, N. Martinez, R. Higa, V. White y A. Jawerbaum (2009). "MMP/TIMP balance is modulated in vitro by 15dPGJ(2) in fetuses and placentas from diabetic rats." *Eur J Clin Invest* 39(12): 1082-1090.
- Radaelli, T., J. Lepercq, A. Varastehpour, S. Basu, P. M. Catalano y S. Hauguel-De Mouzon (2009). "Differential regulation of genes for fetoplacental lipid pathways in pregnancy with gestational and type 1 diabetes mellitus." *Am J Obstet Gynecol* 201(2): 209 e201-209 e210.
- Rakieten, N., M. L. Rakieten y M. R. Nadkarni (1963a). "Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917)." *Cancer Chemother Rep* 29: 91-98.
- Reece, E. A. (1999). "Maternal fuels, diabetic embryopathy: pathomechanisms and prevention." *Semin Reprod Endocrinol* 17(2): 183-194.
- Reece, E. A. (2012). "Diabetes-induced birth defects: what do we know? What can we do?" *Curr Diab Rep* 12(1): 24-32.
- Reece, E. A., Y. K. Wu, Z. Zhao y D. Dhanasekaran (2006). "Dietary vitamin and lipid therapy rescues aberrant signaling and apoptosis and prevents hyperglycemia-induced diabetic embryopathy in rats." *Am J Obstet Gynecol* 194(2): 580-585.
- Rees, D. A. y J. C. Alcolado (2005). "Animal models of diabetes mellitus." *Diabet Med* 22(4): 359-370.
- Rees, W. D., C. J. McNeil y C. A. Maloney (2008). "The Roles of PPARs in the Fetal Origins of Metabolic Health and Disease." *PPAR Res* 2008: 459030.
- Rehan, V. K. y J. S. Torday (2012). "PPARgamma Signaling Mediates the Evolution, Development, Homeostasis, and Repair of the Lung." *PPAR Res* 2012: 289867.

- Ricote, M., A. C. Li, T. M. Willson, C. J. Kelly y C. K. Glass (1998). "The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation." *Nature* 391(6662): 79-82.
- Ricote, M. y C. K. Glass (2007). "PPARs and molecular mechanisms of transrepression." *Biochim Biophys Acta* 1771(8): 926-935.
- Ringseis, R., A. Gutgesell, C. Dathe, C. Brandsch y K. Eder (2007). "Feeding oxidized fat during pregnancy up-regulates expression of PPARalpha-responsive genes in the liver of rat fetuses." *Lipids Health Dis* 6: 6.
- Robert, M. F., R. K. Neff, J. P. Hubbell, H. W. Taeusch y M. E. Avery (1976). "Association between maternal diabetes and the respiratory-distress syndrome in the newborn." *N Engl J Med* 294(7): 357-360.
- Roep, B. O., H. S. Hiemstra, N. C. Schloot, R. R. De Vries, A. Chaudhuri, P. O. Behan y J. W. Drijfhout (2002). "Molecular mimicry in type 1 diabetes: immune cross-reactivity between islet autoantigen and human cytomegalovirus but not Coxsackie virus." *Ann N Y Acad Sci* 958: 163-165.
- Rooney, S. A., S. L. Young y C. R. Mendelson (1994). "Molecular and cellular processing of lung surfactant." *Faseb J* 8(12): 957-967.
- Rosen, E. D., C. H. Hsu, X. Wang, S. Sakai, M. W. Freeman, F. J. Gonzalez y B. M. Spiegelman (2002). "C/EBPalpha induces adipogenesis through PPARgamma: a unified pathway." *Genes Dev* 16(1): 22-26.
- Rosen, E. D. y O. A. MacDougald (2006). "Adipocyte differentiation from the inside out." *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(12): 885-896.
- Salleh, N. (2014). "Diverse roles of prostaglandins in blastocyst implantation." *ScientificWorldJournal* 2014: 968141.
- Samarghandian, S., R. Afshari y A. Sadati (2014). "Evaluation of lung and bronchoalveolar lavage fluid oxidative stress indices for assessing the preventing effects of safranal on respiratory distress in diabetic rats." *ScientificWorldJournal* 2014: 251378.
- San Martin, R. y L. Sobrevia (2006). "Gestational diabetes and the adenosine/L-arginine/nitric oxide (ALANO) pathway in human umbilical vein endothelium." *Placenta* 27(1): 1-10.
- Sato, H., M. Ishikawa, H. Sugai, A. Funaki, Y. Kimura, M. Sumitomo y K. Ueno (2014). "Sex hormones influence expression and function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in adipocytes: pathophysiological aspects." *Horm Mol Biol Clin Investig* 20(2): 51-61.
- Sauer, S. (2015). "Ligands for the Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma." *Trends Pharmacol Sci* 36(10): 688-704.
- Schaefer-Graf, U. M., J. Pawliczak, D. Passow, R. Hartmann, R. Rossi, C. Buhner, T. Harder, A. Plagemann, K. Vetter y O. Kordonouri (2005). "Birth weight and parental BMI predict overweight in children from mothers with gestational diabetes." *Diabetes Care* 28(7): 1745-1750.
- Schaefer-Graf, U. M., K. Graf, I. Kulbacka, S. L. Kjos, J. Dudenhausen, K. Vetter y E. Herrera (2008). "Maternal lipids as strong determinants of fetal environment and growth in pregnancies with gestational diabetes mellitus." *Diabetes Care* 31(9): 1858-1863.
- Schaiff, W. T., F. F. Knapp, Jr., Y. Barak, T. Biron-Shental, D. M. Nelson y Y. Sadovsk y (2007). "Ligand-activated peroxisome proliferator activated receptor gamma alters placental morphology and placental fatty acid uptake in mice." *Endocrinology* 148(8): 3625-3634.
- Scher, J. U. y M. H. Pillinger (2005). "15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin?" *Clin Immunol* 114(2): 100-109.
- Schmitz, G. y T. Langmann (2005). "Transcriptional regulatory networks in lipid metabolism control ABCA1 expression." *Biochim Biophys Acta* 1735(1): 1-19.
- Schneider, C., S. P. Nobs, M. Kurrer, H. Rehrauer, C. Thiele y M. Kopf (2014). "Induction of the nuclear receptor PPAR-gamma by the cytokine GM-CSF is critical for the differentiation of fetal monocytes into alveolar macrophages." *Nat Immunol* 15(11): 1026-1037.

- Schoonjans, K., B. Staels y J. Auwerx (1996). "Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression." *J Lipid Res* 37(5): 907-925.
- Schwartz, R. y K. A. Teramo (2000). "Effects of diabetic pregnancy on the fetus and newborn." *Semin Perinatol* 24(2): 120-135.
- Seaborn, T., M. Simard, P. R. Provost, B. Piedboeuf y Y. Tremblay (2010). "Sex hormone metabolism in lung development and maturation." *Trends Endocrinol Metab* 21(12): 729-738.
- Sears, C. E., E. A. Ashley y B. Casadei (2004). "Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component?" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359(1446): 1021-1044.
- Shi, W., S. Bellusci y D. Warburton (2007). "Lung development and adult lung diseases." *Chest* 132(2): 651-656.
- Sies, H. y E. Cadenas (1985). "Oxidative stress: damage to intact cells and organs." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 311(1152): 617-631.
- Simeoni, U. y D. J. Barker (2009). "Offspring of diabetic pregnancy: long-term outcomes." *Semin Fetal Neonatal Med* 14(2): 119-124.
- Simon, D. M., M. C. Arian, S. Srisuma, S. Bhattacharya, L. W. Tsai, E. P. Ingenito, F. Gonzalez, S. D. Shapiro y T. J. Mariani (2006). "Epithelial cell PPAR[gamma] contributes to normal lung maturation." *Faseb J* 20(9): 1507-1509.
- Singh, J., N. K. Verma, S. M. Kansagra, B. N. Katey C. S. Dey (2007). "Altered PPARgamma expression inhibits myogenic differentiation in C2C12 skeletal muscle cells." *Mol Cell Biochem* 294(1-2): 163-171.
- Sinha, R., S. Dufour, K. F. Petersen, V. LeBon, S. Enoksson, Y. Z. Ma, M. Savoye, D. L. Rothman, G. I. Shulman y S. Caprio (2002). "Assessment of skeletal muscle triglyceride content by (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy in lean and obese adolescents: relationships to insulin sensitivity, total body fat, and central adiposity." *Diabetes* 51(4): 1022-1027.
- Soriano, F. G., L. Virag y C. Szabo (2001). "Diabetic endothelial dysfunction: role of reactive oxygen and nitrogen species production and poly(ADP-ribose) polymerase activation." *J Mol Med (Berl)* 79(8): 437-448.
- Sosenko, I. R., S. M. Innis y L. Frank (1988). "Polyunsaturated fatty acids and protection of newborn rats from oxygen toxicity." *J Pediatr* 112(4): 630-637.
- Stadtman, E. R. (2006). "Protein oxidation and aging." *Free Radic Res* 40(12): 1250-1258.
- Steinmetz, M., T. Quentin, A. Poppe, T. Paul y C. Jux (2005). "Changes in expression levels of genes involved in fatty acid metabolism: upregulation of all three members of the PPAR family (alpha, gamma, delta) and the newly described adiponectin receptor 2, but not adiponectin receptor 1 during neonatal cardiac development of the rat." *Basic Res Cardiol* 100(3): 263-269.
- Storino, M., M. Contreras, J. Rojano, R. Serrano y A. Nouel (2014). "Complicaciones de la diabetes y su asociación con el estrés oxidativo: un viaje hacia el daño endotelial " *Revista colombiana de cardiología* 21(6): 392-398.
- Straus, D. S. y C. K. Glass (2007). "Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms." *Trends Immunol* 28(12): 551-558.
- Stumvoll, M., B. J. Goldstein y T. W. van Haeften (2005). "Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy." *Lancet* 365(9467): 1333-1346.
- Sucani, S. M., J. Alvarías, M. C. Faingold, M. L. Glatstein, C. D. Gonzalez, S. Salzberg y G. Rovira (2014). "Prevalencia de diabetes gestacional en argentina y complicaciones materno-feto-neonatales según los distintos criterios diagnósticos." *Rev. Soc. Arg. Diabetes* 48: 82-83.
- Suzuki, T., Y. Ikeda, H. Yoshikawa, K. Tanaka, H. Morita, M. Yamamoto y T. Takizawa (2009). "Gestational changes in production of NO and expression of NOS mRNA isoforms in the rat placenta." *J Vet Med Sci* 71(4): 495-498.
- Szabo, C. (2003). "Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity." *Toxicol Lett* 140-141: 105-112.

- Szabo, C. (2009). "Role of nitrosative stress in the pathogenesis of diabetic vascular dysfunction." *Br J Pharmacol* 156(5): 713-727.
- Tan, N. S., L. Michalik, B. Desvergne y W. Wahli (2005). "Multiple expression control mechanisms of peroxisome proliferator-activated receptors and their target genes." *J Steroid Biochem Mol Biol* 93(2-5): 99-105.
- Thaler, C. D. y D. Epel (2003). "Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya." *Curr Pharm Des* 9(5): 399-409.
- Thomas, B. A., K. Ghebremeskel, C. Lowy, B. Offley-Shore y M. A. Crawford (2005). "Plasma fatty acids of neonates born to mothers with and without gestational diabetes." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 72(5): 335-341.
- Thomas, D. D., L. A. Ridnour, J. S. Isenberg, W. Flores-Santana, C. H. Switzer, S. Donzelli, P. Hussain, C. Vecoli, N. Paolucci, S. Ambs, C. A. Colton, C. C. Harris, D. D. Roberts y D. A. Wink (2008). "The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling." *Free Radic Biol Med* 45(1): 18-31.
- Tiboni, G. M. y A. Ponzano (2014). "Nitric oxide and teratogenesis: an update." *Curr Pharm Des* 20(34): 5443-5447.
- Toescu, V., S. L. Nuttall, U. Martin, M. J. Kendall y F. Dunne (2002). "Oxidative stress and normal pregnancy." *Clin Endocrinol (Oxf)* 57(5): 609-613.
- Toescu, V., S. L. Nuttall, U. Martin, P. Nightingale, M. J. Kendall, P. Brydon y F. Dunne (2004). "Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes." *Clin Sci (Lond)* 106(1): 93-98.
- Tontonoz, P., E. Hu, R. A. Graves, A. I. Budavari y B. M. Spiegelman (1994). "mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer." *Genes Dev* 8(10): 1224-1234.
- Tontonoz, P., L. Nagy, J. G. Alvarez, V. A. Thomazy y R. M. Evans (1998). "PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL." *Cell* 93(2): 241-252.
- Tortora, D. (2011). *Principios de anatomía y fisiología* 11ª Ed. Editorial Panamericana.
- Trevino-Alanis, M., J. Ventura-Juarez, J. Hernandez-Pinero, A. Nevarez-Garza, A. Quintanar-Stephano y A. Gonzalez-Pina (2009). "Delayed lung maturation of foetus of diabetic mother rats develop with a diminish, but without changes in the proportion of type I and II pneumocytes, and decreased expression of protein D-associated surfactant factor." *Anat Histol Embryol* 38(3): 169-176.
- Trnkova, L., J. Drsata y I. Bousova (2015). "Oxidation as an important factor of protein damage: Implications for Maillard reaction." *J Biosci* 40(2): 419-439.
- Turko, I. V., S. Marcondes y F. Murad (2001). "Diabetes-associated nitration of tyrosine and inactivation of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(6): H2289-2294.
- Tuuli, M. G., M. S. Longtine y D. M. Nelson (2011). "Review: Oxygen and trophoblast biology--a source of controversy." *Placenta* 32 Suppl 2: S109-118.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur y J. Telser (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.
- Varanasi, U., R. Chu, Q. Huang, R. Castellon, A. V. Yeldandi y J. K. Reddy (1996). "Identification of a peroxisome proliferator-responsive element upstream of the human peroxisomal fatty acyl coenzyme A oxidase gene." *J Biol Chem* 271(4): 2147-2155.
- Varga, Z. V., Z. Giricz, L. Liaudet, G. Hasko, P. Ferdinandy y P. Pacher (2015). "Interplay of oxidative, nitrosative/nitrative stress, inflammation, cell death and autophagy in diabetic cardiomyopathy." *Biochim Biophys Acta* 1852(2): 232-242.
- Vela-Huerta, M., A. Aguilera-Lopez, S. Alarcon-Santos, N. Amador, C. Aldana-Valenzuela y A. Heredia (2007). "Cardiopulmonary adaptation in large for gestational age infants of diabetic and nondiabetic mothers." *Acta Paediatr* 96(9): 1303-1307.
- Viswakarma, N., Y. Jia, L. Bai, A. Vluggens, J. Borensztajn, J. Xu y J. K. Reddy (2010). "Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression." *PPAR Res* 2010.
- Vu, T. H. y Z. Werb (2000). "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology." *Genes Dev* 14(17): 2123-2133.

- Wahli, W. y L. Michalik (2012). "PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation." *Trends Endocrinol Metab.* 23(7):351-63
- Wang, F., E. A. Reece y P. Yang (2015b). "Advances in revealing the molecular targets downstream of oxidative stress-induced proapoptotic kinase signaling in diabetic embryopathy." *Am J Obstet Gynecol* 213(2): 125-134.
- Wang, F., E. A. Reece y P. Yang (2015c). "Oxidative stress is responsible for maternal diabetes-impaired transforming growth factor beta signaling in the developing mouse heart." *Am J Obstet Gynecol* 212(5): 650 e651-611.
- Wang, F., S. A. Fisher, J. Zhong, Y. Wu y P. Yang (2015a). "Superoxide Dismutase 1 in vivo Ameliorates Maternal Diabetes-Induced Apoptosis and Heart Defects through Restoration of Impaired Wnt Signaling." *Circ Cardiovasc Genet.* 8(5):665-76
- Wang, Q., H. Fujii y G. T. Knipp (2002). "Expression of PPAR and RXR isoforms in the developing rat and human term placentas." *Placenta* 23(8-9): 661-671.
- Wang, Y., J. Santos, R. Sakurai, E. Shin, L. Cerny, J. S. Torday y V. K. Rehan (2009). "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists enhance lung maturation in a neonatal rat model." *Pediatr Res* 65(2): 150-155.
- Werman, A., A. Hollenberg, G. Solanes, C. Bjorbaek, A. J. Vidal-Puig y J. S. Flier (1997). "Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin." *J Biol Chem* 272(32): 20230-20235.
- White, V., A. Jawerbaum, D. Sinner, C. Pustovrh, E. Capobianco y E. Gonzalez (2002). "Oxidative stress and altered prostanoid production in the placenta of streptozotocin-induced diabetic rats." *Reprod Fertil Dev* 14(1-2): 117-123.
- White, V., A. Jawerbaum, M. B. Mazzucco, M. Gauster, G. Desoye y U. Hiden (2015). "Diabetes-associated changes in the fetal insulin/insulin-like growth factor system are organ specific in rats." *Pediatr Res* 77(1-1): 48-55.
- White, V., E. Capobianco, R. Higa, N. Martinez, M. Sosa, M. C. Pustovrh y A. Jawerbaum (2010). "Increased nitration and diminished activity of copper/zinc superoxide dismutase in placentas from diabetic rats." *Free Radic Res* 44(12): 1407-1415.
- White, V., E. Gonzalez, E. Capobianco, C. Pustovrh, C. Sonez, M. C. Romanini y A. Jawerbaum (2004). "Modulatory effect of leptin on nitric oxide production and lipid metabolism in term placental tissues from control and streptozotocin-induced diabetic rats." *Reprod Fertil Dev* 16(3): 363-372.
- Williams, C. M. y G. Burdge (2006). "Long-chain n-3 PUFA: plant v. marine sources." *Proc Nutr Soc* 65(1): 42-50.
- Wiznitzer, A., B. Furman, M. Mazor y E. A. Reece (1999). "The role of prostanoids in the development of diabetic embryopathy." *Semin Reprod Endocrinol* 17(2): 175-181.
- Xu, H. E., M. H. Lambert, V. G. Montana, K. D. Plunket, L. B. Moore, J. L. Collins, J. A. Oplinger, S. A. Kliewer, R. T. Gampe, Jr., D. D. McKee, J. T. Moore y T. M. Willson (2001). "Structural determinants of ligand binding selectivity between the peroxisome proliferator-activated receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24): 13919-13924.
- Xue, C., P. R. Reynolds y R. A. Johns (1996). "Developmental expression of NOS isoforms in fetal rat lung: implications for transitional circulation and pulmonary angiogenesis." *Am J Physiol* 270(1 Pt 1): L88-100.
- Yamasaki, S., T. Nakashima, A. Kawakami, T. Miyashita, H. Ida, K. Migita, K. Nakatay K. Eguchi (2002). "Functional changes in rheumatoid fibroblast-like synovial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated signalling pathway." *Clin Exp Immunol* 129(2): 379-384.
- Yan, J., X. Li, R. Su, K. Zhang y H. Yang (2014). "Long-term effects of maternal diabetes on blood pressure and renal function in rat male offspring." *PLoS One* 9(2): e88269.
- Yang, J., Q. Xue, L. Miao y L. Cai (2011). "Pulmonary fibrosis: a possible diabetic complication." *Diabetes Metab Res Rev* 27(4): 311-317.

- Yang, P., Y. Cao y H. Li (2010). "Hyperglycemia induces inducible nitric oxide synthase gene expression and consequent nitrosative stress via c-Jun N-terminal kinase activation." *Am J Obstet Gynecol* 203(2): 185 e185-111.
- Yang, P., Z. Zhao y E. A. Reece (2008). "Activation of oxidative stress signaling that is implicated in apoptosis with a mouse model of diabetic embryopathy." *Am J Obstet Gynecol* 198(1): 130 e131-137.
- Yang, Q. y Y. Li (2007). "Roles of PPARs on regulating myocardial energy and lipid homeostasis." *J Mol Med (Berl)* 85(7): 697-706.
- Yessoufou, A., A. Hichami, P. Besnard, K. Moutairou y N. A. Khan (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency increases the risk of maternal abortion and neonatal mortality in murine pregnancy with or without diabetes mellitus: Modulation of T cell differentiation." *Endocrinology* 147(9): 4410-4418.
- Yessoufou, A., M. P. Nekoua, A. Gbankoto, Y. Mashalla y K. Moutairou (2015). "Beneficial effects of omega-3 polyunsaturated Fatty acids in gestational diabetes: consequences in macrosomia and adulthood obesity." *J Diabetes Res* 2015: 731434.
- Yoo, S. H., O. Park, L. E. Henderson, M. A. Abdelmegeed, K. H. Moon y B. J. Song (2011). "Lack of PPARalpha exacerbates lipopolysaccharide-induced liver toxicity through STAT1 inflammatory signaling and increased oxidative/nitrosative stress." *Toxicol Lett* 202(1): 23-29.
- Yoon, M. (2009). "The role of PPARalpha in lipid metabolism and obesity: focusing on the effects of estrogen on PPARalpha actions." *Pharmacol Res* 60(3): 151-159.
- Young, S. L., K. Evans y J. P. Eu (2002). "Nitric oxide modulates branching morphogenesis in fetal rat lung explants." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282(3): L379-385.
- Zabihi, S. y M. R. Loeken (2010). "Understanding diabetic teratogenesis: where are we now and where are we going?" *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88(10): 779-790.
- Zadegan, F. G., K. Ghaedi, S. M. Kalantar, M. Peymani, M. S. Hashemi, H. Baharvand y M. H. Nasr-Esfahani (2015). "Cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells is influenced by a PPAR gamma/PGC-1alpha-FNDC5 pathway during the stage of cardiac precursor cell formation." *Eur J Cell Biol* 94(6): 257-266.
- Zambuzzi, W. F., K. B. Paiva, A. C. Batista, V. S. Lara y J. M. Granjeiro (2009). "Immunohistochemical approach reveals involvement of inducible nitric oxide synthase in rat late development." *J Mol Histol* 40(3): 235-240.
- Zhang, F., F. Liu, M. Yan, H. Ji, L. Hu, X. Li, J. Qian, X. He, L. Zhang, A. Shen y C. Cheng (2010). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists suppress iNOS expression induced by LPS in rat primary Schwann cells." *J Neuroimmunol* 218(1-2): 36-47.
- Zhang, F., F. Yang, H. Zhao y Y. An (2015). "Curcumin alleviates lung injury in diabetic rats by inhibiting NF-kappaB pathway." *Clin Exp Pharmacol Physiol*.
- Zhao, X., X. Lu y Q. Feng (2002). "Deficiency in endothelial nitric oxide synthase impairs myocardial angiogenesis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(6): H2371-2378.
- Zhao, Z. y E. A. Reece (2013). "New concepts in diabetic embryopathy." *Clin Lab Med* 33(2): 207-233.
- Zielinsky, P. y A. L. Piccoli, Jr. (2012). "Myocardial hypertrophy and dysfunction in maternal diabetes." *Early Hum Dev* 88(5): 273-278.