



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**“Diabetes materna: programación de alteraciones en el
útero de la descendencia y efecto de dietas enriquecidas en
aceite de oliva extra virgen”**

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

Lic. Cintia Romina Gatti

Directora de tesis: Dra. Alicia Jawerbaum

Directora adjunta: Dra. Romina Higa

Consejero de estudio: Dr. Eduardo Cánepa

Laboratorio de Reproducción y Metabolismo
Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos
(CEFyBO-CONICET-UBA)

Buenos Aires, 2025

Diabetes materna: programación de alteraciones en el útero de la descendencia y efecto de dietas enriquecidas en aceite de oliva extra virgen.

Resumen

La diabetes en la gestación incrementa el riesgo de complicaciones maternas, placentarias y fetales, afectando la salud del neonato y conduciendo a la programación de patologías evidentes a lo largo de la vida de la descendencia. En el presente trabajo estudiamos mecanismos implicados en la programación de alteraciones uterinas y deciduales en ratas Wistar descendientes de ratas con diabetes pregestacional. Para ello, generamos un modelo de diabetes pregestacional moderada inducido por estreptozotocina administrada en forma neonatal. En las crías de ratas sanas y diabéticas, se estudió al útero decidualizado evaluando marcadores de función decidua, las vías de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) y la vía del blanco mecanístico de rapamicina (mTOR), así como su regulación por microRNAs. También se evaluó a la decidua de ratas en el día 9 de preñez en el período de postimplantación temprana (gestación de la F1), y al útero en período fetal en la gestación F0 de ratas sanas y diabéticas. Además, brindamos, durante la gestación de la F0, tratamientos maternos dietarios enriquecidos en aceite de oliva extra virgen, ricos en agonistas de los PPAR, para luego evaluar su efecto en el útero decidualizado, en la decidua en gestación temprana y el útero en etapa fetal.

En primer lugar, evidenciamos alteraciones en los niveles de marcadores de función decidua, como prolactina y su receptor, en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas diabéticas. Además, los niveles de PPAR α y PPAR γ se encontraron alterados, anomalías vinculadas a microRNAs que los regulan, mientras que PPAR δ se mantuvo sin cambios. También se observó un entorno prooxidante/proinflamatorio y menor actividad de la vía de mTOR en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas diabéticas.

Al evaluar la decidua en la gestación temprana, en el día 9 de preñez, también se evidenciaron alteraciones en marcadores de función decidual, en las vías de los PPAR y de mTOR, así como presencia de un entorno prooxidante/proinflamatorio, en ratas descendientes de ratas diabéticas.

Varias de las alteraciones presentes en ratas adultas se evidenciaron en el útero de fetos de 21 días provenientes de ratas diabéticas preñadas (F0), lo que evidencia el posible origen fetal de la adversa programación que se observó al analizar a la F1 en la etapa prepuberal y durante la gestación temprana.

De interés, la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen brindada durante la gestación de la F0, fue capaz de prevenir, al menos en parte, la programación de alteraciones en vías clave en el desarrollo, la función uterina y decidual, y capaz de reducir el entorno prooxidante/proinflamatorio en el útero y la decidua de la descendencia de ratas con diabetes.

Palabras clave: diabetes materna, útero, decidua, PPAR, mTOR, entorno prooxidante, entorno proinflamatorio, aceite de oliva extra virgen, microRNA.

Maternal diabetes: programming of uterine alterations in the offspring and the effect of diets enriched in extra virgin olive oil.

Abstract

Maternal diabetes increases the risk of adverse maternal, placental and fetal outcomes and impairs neonatal health, leading to the programming of diseases that will be evident throughout the life of the newborn. In the present work, we studied mechanisms involved in the programming of uterine and decidual alterations in the offspring of Wistar rats with pregestational diabetes. To achieve this, we generated a model of moderate pregestational diabetes induced by streptozotocin, which was administered in the neonatal period. In the offspring of control and diabetic rats, the decidualized uterus was studied by evaluating markers of decidual function, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathways, as well as their regulation by microRNAs. We also studied the decidua of rats at day 9 of pregnancy in the early post-implantation period (F1 generation), and the uterus of 21-day female fetuses of control and diabetic rats in the F0 gestation.

In addition, maternal dietary treatments supplemented with extra virgin olive oil, enriched PPAR ligands, were provided during the F0 pregnancy to further evaluate their effects on the decidualized uterus, the decidua in early pregnancy and the fetal uterus.

As results, we found altered markers of decidual function, such as prolactin and its receptor, in the decidualized uterus of the prepubertal offspring of diabetic rats. In addition, alterations in PPAR α and PPAR γ levels were found, alterations associated with changes in microRNAs targeting these PPAR isotypes, whereas PPAR δ remained unchanged. In parallel with these changes, we found evidence of a pro-oxidant/proinflammatory environment in the decidualized uterus of prepubertal offspring of diabetic rats. Moreover, a reduced mTOR pathway activity was found in the decidualized uterus of prepubertal offspring of diabetic rats.

When the decidua was evaluated in early pregnancy, at day 9 of gestation, alterations in decidual function markers, PPAR and mTOR pathways, and the presence of a pro-oxidant/proinflammatory environment, were found in the offspring of diabetic rats.

Several of the alterations evidenced in the offspring were evident in utero at the fetal stage in the F0 pregnancy of diabetic rats, an evidence of the fetal origin of the adverse programming observed when analysing the F1 at the prepubertal stage and during early gestation.

Interestingly, the maternal diet supplemented with extra virgin olive oil provided to the diabetic dams during the F0 gestation was able to prevent, at least in part, the programming of alterations in key pathways involved in uterine and decidual function, and to regulate the pro-oxidant/proinflammatory environment in the uterus and decidua of the offspring.

Keywords: maternal diabetes, uterus, decidua, PPAR, mTOR, pro-oxidant environment, proinflammatory environment, extra virgin olive oil, microRNA.

*A Juanma y Manu,
por ser mi motor, mi refugio
y la razón por la que nunca dejé de soñar.
Este logro también es suyo.*

Agradecimientos

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que, de una u otra manera, formaron parte de este proyecto y fueron fundamentales para que hoy pueda llegar a esta etapa.

En primer lugar, a la Dra. Alicia Jawerbaum, mi directora de tesis doctoral, por su formación, su guía constante y por estar siempre presente con una generosidad y compromiso que valoro profundamente.

A la Dra. Romina Higa, mi co-directora de lujo en este trabajo, por su invaluable transmisión de conocimientos, su experiencia y su apoyo incondicional tanto en lo académico como en lo personal.

A la Dra. Evangelina Capobianco, por ayudarme tanto y estar siempre presente y, con tu buena onda, alegrarnos cada día.

A quienes fueron parte de este hermoso equipo de trabajo: Sabri, Dal, Vero, Day y Flor H., quienes, con paciencia y dedicación, contribuyeron constantemente a mi formación, brindándome su confianza y apoyo.

A mis compañeros esenciales del labo: Lau, Iru, Luti, Flor, Vir y Ale. Gracias por acompañarme en este recorrido, por compartir cada día de trabajo, risas, mates y aprendizajes.

Agradezco también a las instituciones que hicieron posible la realización de esta tesis doctoral: al Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-UBA-CONICET) y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). Asimismo, a todas las personas dentro de estas instituciones que colaboraron y facilitaron mi trabajo. A Verónica Montero, del hospital San Juan de Dios, por su colaboración, siempre con tanta predisposición y amabilidad.

A Juanma, mi compañero de vida, por su apoyo incondicional, por su amor y por ser mi sostén cada día. A Manu, mi pequeño gran amor, que revolucionó mi mundo y me llena de felicidad. Son mi pilar fundamental.

A mis papás, por ser mi mayor orgullo y mi ejemplo a seguir. Por acompañarme en cada paso que doy. A mi familia 'Claros', por su apoyo constante y por alentarme siempre con tanto cariño.

A mis amigas de toda la vida, y a mis amigas de la ciencia, quienes han estado siempre a mi lado, apoyándome, escuchándome con amor y dedicación.

Las palabras nunca son suficientes, pero **¡GRACIAS CON TODO MI CORAZÓN!**

Abreviaturas

4E-BP1: Proteína de unión al factor de iniciación eucariota 4E

4-HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

ADA: Asociación Americana de Diabetes

ALAD: Asociación Latinoamericana de Diabetes

CAT: Catalasa

DM: Diabetes Mellitus

DMT1: Diabetes Mellitus tipo 1

DMT2: Diabetes Mellitus tipo 2

FABP4: Proteína de unión a ácidos grasos 4

FoxO1: del inglés, *Forkhead Box O1*

FSH: Hormona folículo estimulante

GRB10: del inglés, *growth factor receptor-bound protein 10*

hCG: Gonadotrofina coriónica humana

IGFBP1: Proteína de unión al factor de crecimiento insulínico de tipo 1

IL-1 β : Interleuquina 1- β

LH: Hormona luteinizante

MMP9: Metaloproteasa 9

MnSOD: Manganese superóxido dismutasa

mTOR: blanco de la rapamicina en los mamíferos (*del inglés "mammalian target of Rapamycin"*)

MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados

OMS: Organización Mundial de la Salud

PLIN2: Perilipina 2

PMSG: Gonadotrofina sérica de yegua preñada

PPAR: Receptores activados por proliferadores peroxisomales

PRL: Prolactina

PTEN: Homólogo a tensina y fosfatasa

PTOG: Prueba de tolerancia oral a la glucosa

PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados

ROS: Especies reactivas de oxígeno

rPRL: Receptor de prolactina

rpS6: Proteína ribosómica S6

RXR: Receptor X retinoide

SAD: Sociedad Argentina de Diabetes

SIRT1: Sirtuína 1

STZ: Estreptozotocina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

uNK: Células natural killer uterinas

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

Índice

ÍNDICE

Introducción	5
Diabetes mellitus.....	6
Tipos de Diabetes mellitus	6
Diabetes mellitus pregestacional	8
Diabetes mellitus gestacional	8
Modelos animales de diabetes en la gestación	14
Modelos inducidos por dietas	15
Modelos inducidos por sustancias químicas	17
Alteraciones intrauterinas y programación fetal.....	18
El útero de la rata	21
La decidua.....	25
El útero y la decidua en la diabetes materna.....	31
Entorno prooxidante y proinflamatorio.....	32
Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR)	34
Participación de la vía de los PPAR en la gestación	40
La vía de mTOR.....	42
mTORC1.....	43
mTORC2.....	46
Participación de mTOR en la gestación	47
Regulación por microRNAs	48
Tratamientos maternos dietarios enriquecidos en ácidos grasos insaturados	52
Hipótesis y objetivos.....	55
Hipótesis.....	56
Objetivos	56
Objetivos específicos	57
Materiales y métodos.....	59
Materiales	60
Sales y solventes	60
Soluciones y medios de incubación	60
Drogas y reactivos	61
Kits comerciales de revelado.....	62
Anticuerpos	62
Primers.....	63
Equipos	64

<i>Programas de análisis de imagen</i>	64
<i>Programa de análisis estadístico</i>	64
<i>Otros</i>	64
Métodos	65
Animales	65
<i>Modelo animal</i>	65
<i>Modelo experimental de Diabetes</i>	65
<i>Apareo</i>	66
<i>Tratamiento materno con aceite de oliva extra virgen</i>	67
<i>Grupos experimentales evaluados</i>	68
<i>Obtención de muestras</i>	70
<i>Determinaciones plasmáticas</i>	71
<i>Determinación de proteínas</i>	71
<i>Determinación de niveles de proteínas mediante Western blot</i>	72
<i>Localización de proteínas mediante la técnica de inmunohistoquímica</i>	73
<i>Extracción de ARNm y microRNAs</i>	74
<i>Análisis de ARNm por PCR en tiempo real</i>	75
<i>Análisis de microRNAs por PCR en tiempo real</i>	76
<i>Análisis estadístico</i>	77
Resultados	78
Capítulo 1:	79
Efecto de la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen en el útero deciduado de crías prepúberes de ratas diabéticas.	79
1.1. Glucemias y parámetros morfométricos en las ratas prepúberes.....	80
1.2. Marcadores de deciduación en el útero deciduado de ratas prepúberes	83
1.3. Niveles de los PPAR y de los microRNAs que los regulan en el útero deciduado de ratas prepúberes.....	88
1.4. Vías proinflamatorias y prooxidantes en el útero deciduado de ratas prepúberes ...	92
1.5. Vía de señalización de mTOR en el útero deciduado de ratas prepúberes	97
Capítulo 2:	101
Efecto de la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen en la decidua de ratas (F1) en el día 9 de gestación, descendientes de ratas diabéticas (F0).	101
2.1. Glucemias, número de embriones implantados y tasa de reabsorciones embrionarias en ratas F1, en el día 9 de gestación.....	102
2.2. Marcadores de deciduación, niveles de los PPAR y de microRNAs que los regulan en la decidua de la F1 en el día 9 de gestación	103
2.3. Vías prooxidantes y proinflamatorias en la decidua de la F1 en el día 9 de gestación ..	108

2.4. Vía de señalización de mTOR en la decidua de la F1 en el día 9 de gestación	110
Capítulo 3:	113
Efecto de la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen en el útero de fetos de ratas con diabetes en el día 21 de gestación.	113
3.1. Glucemias fetales	114
3.2. Prolactina y FABP4 en el útero fetal	114
3.3. Niveles de ARNm de los PPAR y de microRNAs que los regulan en el útero fetal	116
3.4. Vías proinflamatorias y prooxidantes en el útero fetal	120
Discusión	123
Conclusiones.....	144
Bibliografía.....	147

Introducción

Diabetes mellitus

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica caracterizada por la hiperglucemia que resulta de una anómala secreción de insulina, alteraciones en la función de la misma o de ambas alteraciones (Darenskaya *et al.*, 2021). Actualmente, muchos países están al borde de una “epidemia” mundial de diabetes, que se está extendiendo rápidamente por todo el planeta (Selvin y Juraschek 2020). Según el grado de hiperglucemia, se incrementa el riesgo de daño, disfunción y falla de varios órganos y tejidos, y el desarrollo de complicaciones microvasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía) y macrovasculares (trastornos cardiovasculares) (Harding *et al.*, 2019). Así, esta patología tiene una importancia clínica y socioeconómica significativa. Aunque se han realizado constantes investigaciones y avances en el tratamiento de la diabetes, las personas con DM siguen experimentando impactos adversos clínicos, psicológicos, sociales y económicos que afectan su vida diaria (Hunter 2016; Afroz *et al.*, 2018; Manne-Goehler *et al.*, 2019).

Tipos de Diabetes mellitus

Los principales tipos de diabetes mellitus son la diabetes tipo 1 (DMT1), la diabetes tipo 2 (DMT2) y la diabetes mellitus gestacional, aunque cada vez se distinguen más tipos de diabetes menos prevalentes. Cada tipo de diabetes se caracteriza por problemas diferentes en la regulación de la producción, secreción y/o acción de la insulina (Boron y Boulpaep 2016). La DMT1 resulta de una destrucción autoinmune de las células β del páncreas, lo que lleva a una deficiencia casi total en la producción de insulina. Por otro lado, la DMT2 se desarrolla debido a un deterioro progresivo de las células β en un contexto de resistencia a la insulina (Harreiter y Roden 2019). La diabetes mellitus gestacional ocurre cuando hay fallas en la adaptación del páncreas a los propios cambios del embarazo, tanto vinculado a una insuficiente secreción de insulina o a una insulinoresistencia que excede a la insulinoresistencia fisiológica propia de la gestación normal, que es necesaria para optimizar el suministro de nutrientes al feto en desarrollo (Schaefer-Graf *et al.*, 2018; Hivert *et al.*, 2024).

Tanto la DMT1 como la DMT2 son patologías multifactoriales con manifestaciones clínicas muy diversas. Tradicionalmente, se considera que la DMT1 suele aparecer en la infancia temprana, presentando al debut síntomas como poliuria, polidipsia y, en un tercio de los casos, cetoacidosis diabética. En contraste, la DMT2 suele diagnosticarse en la adultez, por encima de los 40 años de edad, en personas con factores de riesgo como el sobrepeso, la obesidad y el sedentarismo. En las últimas décadas, sin embargo, se ha visto un aumento en los diagnósticos de DMT2 en población infantil, principalmente debido al aumento del sobrepeso y la obesidad en este grupo poblacional (Harreiter y Roden 2019).

El diagnóstico de los distintos tipos de diabetes se complica aún más con la aparición de nuevas formas de diabetes que resultan de una combinación de factores genéticos, epigenéticos, inmunológicos, metabólicos y ambientales, los cuales provocan un deterioro progresivo de las células β del páncreas y/o mayor insulinoresistencia que conducen a la hiperglucemia. En todos los tipos de diabetes y dependiendo del grado de hiperglucemia, pueden desarrollarse a largo plazo complicaciones crónicas como nefropatía diabética, cardiomiopatía diabética, pie diabético y retinopatía diabética, entre otras (Harreiter y Roden 2019). Entre estos tipos de diabetes menos prevalentes, se destacan la Diabetes Tipo MODY y la Diabetes Tipo LADA. La Diabetes Tipo MODY, por sus siglas en inglés, significa “Diabetes de Inicio en la Madurez en Jóvenes”, es una forma que tiene similitudes con la DMT2. Se caracteriza por una herencia autosómica dominante y suele estar causada por una mutación en un solo gen, por lo que también se la conoce como diabetes monogénica. Dependiendo del gen afectado, se clasifica en MODY 1, MODY 2, MODY 3, MODY 4 y MODY 5. Generalmente, esta forma de diabetes se diagnostica antes de los 25 años. En contraste, la Diabetes Tipo LADA, o “Diabetes Autoinmune Latente en Adultos”, es una diabetes autoinmune que aparece después de los 30 años. Los pacientes con Diabetes Tipo LADA presentan los mismos anticuerpos contra las células β pancreáticas que se encuentran en la DMT1, y suelen mostrar características clínicas tanto de la DMT1 como de la DMT2 (Maddaloni *et al.*, 2020).

Diabetes mellitus pregestacional

La diabetes pregestacional se refiere a casos en los que la DM, ya sea tipo 1 o tipo 2, existe antes del embarazo o cuando los niveles de glucosa en ayunas son superiores a 126 mg/dL en cualquier momento del embarazo (Rovira *et al.*, 2017).

La diabetes materna pregestacional incrementa los riesgos para la madre y el feto. En la madre aumenta el riesgo de preeclampsia y pueden agravarse las complicaciones maternas existentes como la hipertensión, la nefropatía y problemas cardiovasculares (Schaefer-Graf *et al.*, 2018). En cuanto al embrión, la exposición a niveles altos de glucosa durante el primer trimestre puede afectar el desarrollo de órganos, elevando la probabilidad de malformaciones, especialmente en el corazón y el sistema nervioso central (Sugrue y Zera 2018). Además, la diabetes materna está asociada con un crecimiento fetal anormal, que puede manifestarse como macrosomía o restricción del crecimiento, y con un mayor riesgo de muerte fetal intrauterina. En el período perinatal la diabetes materna incrementa el riesgo de hipoglucemia neonatal, síndrome de distrés respiratorio y parto prematuro, entre otros (Eidem *et al.*, 2011; Kanda *et al.*, 2012).

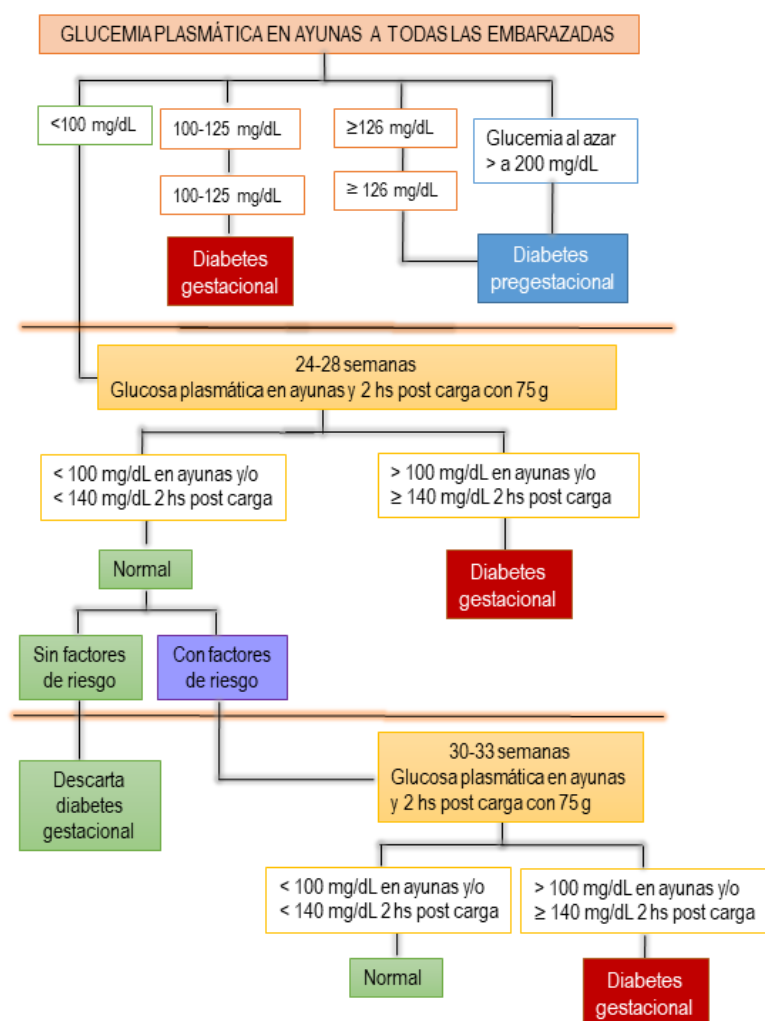
Por lo tanto, es esencial llevar a cabo un control preconcepcional y un seguimiento clínico adecuado durante el embarazo en mujeres con diabetes pregestacional. Esto incluye asesoramiento nutricional e interdisciplinario, así como un control glucémico personalizado para cada paciente. El objetivo es lograr un buen control metabólico mediante la dieta y tratamientos farmacológicos, siendo la insulina o los análogos de insulina los únicos tratamientos farmacológicos considerados en nuestro país seguros durante el embarazo (Rovira *et al.*, 2017).

Diabetes mellitus gestacional

La diabetes gestacional es una de las patologías más comunes durante el embarazo y se define como la intolerancia a la glucosa que se manifiesta por primera vez durante este periodo, actualmente excluyendo a aquellos pacientes que presentan

valores de hiperglucemia mayores a 126 mg/dL, ya que indican que la diabetes era pregestacional y no diagnosticada en forma previa al embarazo (Szmuiłowicz *et al.*, 2019). En general, utilizando los criterios de la OMS de 2013 (basados en los criterios de la Asociación Internacional de Diabetes y Embarazo (IADPSG), se estima que un 14% de los embarazos se ven afectados por diabetes gestacional a nivel mundial (aunque hasta un 40 % de los embarazos pueden verse afectados en algunos países, dependiendo de la etnia y de los métodos de detección utilizados), lo que la convierte en la complicación médica más común en el embarazo (Saeedi *et al.*, 2021; Scheuer *et al.*, 2023).

En Argentina, la prevalencia de diabetes gestacional es del 9,8% según los criterios establecidos por la Asociación Latinoamericana de Diabetes (ALAD) y la Sociedad Argentina de Diabetes (SAD) (Gorban de Lapertosa *et al.*, 2021). Estos criterios definen la diabetes gestacional en pacientes que presentan dos valores de glucemia en ayunas entre 100 mg/dL y 125 mg/dL, o valores de glucemia superiores a 140 mg/dL en la segunda hora de la prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG). La PTOG implica medir la glucemia en ayunas y dos horas después de la ingesta oral de 75 gramos de glucosa (**Esquema 1**) (Salzberg *et al.*, 2016).



Esquema 1: Algoritmo de diagnóstico de diabetes gestacional según la ALAD/SAD.

Durante la gestación normal, se producen cambios fisiológicos para satisfacer las necesidades del feto en desarrollo, incluyendo adaptaciones en los sistemas cardiovascular, renal, hematológico, respiratorio y metabólico. Entre estas adaptaciones, es especialmente relevante el ajuste en la secreción y sensibilidad a la insulina a lo largo del embarazo. Al inicio de la gestación, la secreción y sensibilidad a la insulina aumenta para incrementar las reservas energéticas en preparación para los requerimientos futuros durante el embarazo, siendo a partir de la semana 20 de gestación cuando se incrementa la insulinoresistencia propia del embarazo y en la semana 24 de gestación donde la misma insulinoresistencia está establecida (Catalano 2014; Hivert *et al.*, 2024).

Históricamente, se ha considerado que la diabetes gestacional es una patología inducida por el embarazo que aparece hacia el final del segundo trimestre del mismo. Sin embargo, investigaciones recientes han mostrado que los embarazos con hiperglucemia temprana, presente antes de que sea diagnosticada la diabetes gestacional en la forma clásica, es decir, entre semanas 24 y 28 de gestación, tienen un mayor riesgo de complicaciones y a menudo requieren tratamiento con insulina (Sweeting *et al.*, 2016; Immanuel y Simmons 2017; Hannah *et al.*, 2022). El riesgo de ciertas complicaciones puede reducirse si se trata la diabetes gestacional temprana antes de las 20 semanas de gestación, siendo especialmente beneficioso comenzar el tratamiento alrededor de las 14 semanas (Simmons *et al.*, 2023).

El desarrollo de la diabetes gestacional involucra una combinación de factores genéticos y epigenéticos, en parte estos últimos inducidos por factores nutricionales y ambientales (Franzago *et al.*, 2019). En forma fisiológica la insulinoresistencia que ocurre durante el embarazo está diseñada para redirigir la glucosa hacia el feto, siendo la glucosa la principal fuente energética de feto. Las estimaciones indican que, en un embarazo con diabetes gestacional, la tasa de ingreso de glucosa estimulada por insulina a los órganos maternos se reduce aproximadamente en un 50% en comparación con un embarazo sin diabetes gestacional (Catalano 2014). Las células β del páncreas encargadas de secretar insulina, a menudo no logran incrementar su producción en la forma necesaria para contrarrestar el exceso de glucosa circulante dando lugar a la hiperglucemia que caracteriza a la diabetes gestacional. La incapacidad de las células β pancreáticas maternas para adaptarse a los cambios fisiológicos del embarazo es multifacética y depende de la capacidad del páncreas para ajustarse a estos cambios y a las señales específicas que promueven la hiperplasia de las células β . Tanto las fallas en la adaptación del páncreas en el embarazo como el grado de insulinoresistencia en los tejidos son fundamentales en la fisiopatología de la diabetes gestacional (Hivert *et al.*, 2024).

Es relevante destacar que la insulinoresistencia y un entorno hiperglucémico están relacionados con un aumento en el estrés oxidativo y entorno proinflamatorio. En mujeres con diabetes gestacional, se observa una mayor producción de radicales libres

de oxígeno, así como fallas en los mecanismos encargados de eliminar estos radicales libres (Lappas *et al.*, 2011). En muchos casos, la resistencia a la insulina preexistía antes del embarazo en forma subclínica y puede empeorar frente al desafío que implica la adaptación al embarazo. Las mujeres diagnosticadas con diabetes gestacional a menudo presentan niveles elevados de moléculas proinflamatorias como la proteína C reactiva (PCR), la interleuquina-6 (IL-6), la interleuquina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Nainu *et al.*, 2023). Estos mediadores inflamatorios alteran las vías de señalización de la insulina, lo que resulta en una insulinoresistencia e hiperglucemia. Además, la inflamación exacerba el estrés oxidativo y la disfunción endotelial, lo que plantea riesgos adicionales para la salud tanto de la madre como del feto (Ohashi *et al.*, 2012). Las reacciones inflamatorias relacionadas con el embarazo cumplen una doble función: favorecen la progresión saludable del embarazo y contribuyen a la patología en casos de desregulación. La IL-6, la IL-1 β y el TNF- α desempeñan un papel fundamental en el inicio y la regulación de las respuestas inflamatorias cruciales para la implantación, la placentación y el inicio del parto (Arck y Hecher 2013). La inflamación controlada es vital para la implantación del embrión y el desarrollo placentario. Las células inmunitarias liberan citocinas y quimiocinas que facilitan la invasión de las células del trofoblasto y la remodelación de las arterias espiraladas de la madre, ambas esenciales para una perfusión placentaria adecuada (Mor y Cardenas 2010). Durante el embarazo, se establece un entorno regulador para proteger al feto de una respuesta inapropiada del sistema inmunitario de la madre. Sin embargo, un desequilibrio en los factores proinflamatorios y antiinflamatorios es considerado en parte, causa de complicaciones como parto prematuro, diabetes gestacional y preeclampsia (Ray *et al.*, 2024).

El tejido adiposo secreta sustancias químicas bioactivas conocidas como adipocinas, que desempeñan un papel crucial en la regulación de la inflamación y la homeostasis metabólica de implicancia en la diabetes gestacional. La adipocina antiinflamatoria adiponectina, por ejemplo, mejora la incorporación de glucosa y la oxidación de ácidos grasos, ofreciendo así protección contra la diabetes gestacional y exhibiendo propiedades sensibilizadoras a la insulina (Al-Ofi 2019). Por el contrario, los altos niveles de adipocinas proinflamatorias como la resistina y la leptina en mujeres con diabetes gestacional se asocian con elevada resistencia a la insulina y resultados

adversos del embarazo (Valsamakis *et al.*, 2014). Estas hormonas liposolubles influyen en las respuestas inmunitarias, desencadenan procesos inflamatorios y contribuyen a la alteración del metabolismo de la glucosa durante el embarazo. El tejido adiposo puede transmitir señales a otros tejidos a través de vesículas extracelulares producidas y liberadas por los adipocitos, conociéndose su desregulación en la diabetes gestacional (de Gennaro *et al.*, 2019). Por otro lado, los exosomas son vesículas extracelulares a nanoescala (40-120 nm) liberadas por muchos tipos de células, incluidos los trofoblastos, y presentes en diversos fluidos corporales naturales, como la sangre periférica, la orina, la leche materna y el líquido amniótico (Salomon y Rice 2017). Los exosomas contienen un gran número de proteínas, ARN no codificantes largos y cortos (lncARN y microRNA, respectivamente) y otras sustancias bioactivas que las células liberan para facilitar la comunicación entre ellas. Algunos estudios demostraron que las concentraciones de exosomas en la sangre periférica de las mujeres embarazadas con diabetes gestacional son significativamente superiores a las de las mujeres embarazadas sanas. Es importante destacar que la edad y la presencia de patologías son factores importantes que contribuyen a los cambios en las concentraciones plasmáticas de los exosomas (Nardi Fda *et al.*, 2016; Salomon *et al.*, 2016).

Muchos investigadores están estudiando biomarcadores potenciales en la sangre para predecir el diagnóstico de diabetes gestacional (O'Neill *et al.*, 2016). Los microRNAs exosomales podrían ser potenciales biomarcadores de diabetes gestacional en los primeros trimestres debido a su alta estabilidad en los fluidos corporales y accesibilidad desde los fluidos maternos durante toda la gestación (Morales-Prieto *et al.*, 2020). La exposición a la diabetes gestacional altera la expresión de microRNAs en la descendencia de forma específica para cada tejido. La expresión de microRNAs puede ser un mecanismo potencial a través del cual la diabetes materna programa patologías metabólicas en la descendencia (Shah *et al.*, 2021).

La diabetes gestacional, ya sea temprana o tardía, se asocia con complicaciones a corto y a largo plazo tanto para la madre como para la descendencia (Riskin-Mashiah *et al.*, 2009; Lowe *et al.*, 2019; Bardugo *et al.*, 2023; Dunne *et al.*, 2023). A corto plazo, en la madre hay un mayor riesgo de enfermedades hipertensivas y dislipemias, alteraciones

que afectan el desarrollo y función de la placenta (Barbour 2019). Además, también tienen una mayor tasa de cesáreas en comparación con aquellas sin la patología. A largo plazo, las mujeres embarazadas con diabetes gestacional corren un mayor riesgo de desarrollar diabetes gestacional en los embarazos subsiguientes, y alrededor de la mitad de las mujeres con antecedentes de diabetes gestacional desarrollará DMT2 entre cinco y diez años tras el parto (Noctor y Dunne 2015; Gorban de Lapertosa *et al.*, 2021). Además, a largo plazo es elevado el riesgo materno de sufrir enfermedades cardiovasculares (Yun y Ko 2021).

A nivel fetal, en la diabetes gestacional, las mayores concentraciones de glucosa que atraviesan la barrera placentaria llegan al feto dando lugar a hiperglucemia fetal que lleva a hiperinsulinemia fetal, lo que promueve la adiposidad fetal excesiva y el crecimiento acelerado, pudiendo conducir a la macrosomía fetal (Schaefer-Graf *et al.*, 2018). En contraposición, anomalías placentarias o un entorno prooxidante más severo puede dar lugar a restricción del crecimiento fetal. Son también complicaciones neonatales en esta patología el mayor riesgo de hipoglucemia neonatal, hiperbilirrubinemia y síndrome de distress respiratorio (Sweeting *et al.*, 2022). Con respecto a los efectos a largo plazo, las evidencias indican que la diabetes gestacional está relacionada con la programación intrauterina de enfermedades metabólicas que se manifestarán a lo largo de la vida del neonato (Monteiro *et al.*, 2016). El hijo de una madre con diabetes gestacional tiene mayor riesgo de sufrir enfermedades metabólicas y cardiovasculares, obesidad, intolerancia a la glucosa y DMT2. El riesgo de estas complicaciones depende de la severidad de las hiperglucemias: a mayores niveles de glucosa en el organismo materno, mayor es el riesgo (Sweeting *et al.*, 2022).

Modelos animales de diabetes en la gestación

Para mejorar la exploración y caracterización de la fisiopatología de la diabetes en la gestación se requiere el uso de modelos animales experimentales.

Los modelos animales han sido fundamentales en la investigación y caracterización de la fisiopatología de la diabetes, así como en la evaluación de nuevos tratamientos y agentes terapéuticos *in vivo* (Al-Awar *et al.*, 2016). La DMT1 y DMT2 son enfermedades complejas que involucran diversos sistemas fisiológicos. Por ello, es crucial seleccionar adecuadamente los modelos experimentales según el aspecto específico de la enfermedad que se esté investigando (King 2012).

Particularmente, en el estudio de la diabetes en la gestación, la elección de un correcto modelo experimental permite abordar varios aspectos importantes de los embarazos en mujeres con diabetes, como el aumento de las tasas de abortos espontáneos, malformaciones, deficiencias feto-placentarias y enfermedades de la descendencia en la vida adulta (Jawerbaum y White 2010).

Se pueden obtener modelos experimentales de diabetes durante la gestación mediante: modelos de origen genético, inducción química, procedimientos quirúrgicos o tratamientos dietarios combinados o no con agentes químicos (Jawerbaum y White 2010). Se describen a continuación, algunos modelos que se usan frecuentemente en la actualidad.

Modelos inducidos por dietas

La alta ingesta de azúcares, lípidos y proteínas durante el embarazo no sólo causa obesidad, sino también puede inducir diabetes gestacional. La ingesta excesiva de alimentos ricos en calorías en la dieta aumenta la acumulación de grasa en el cuerpo, promueve la secreción de adipocinas que causan obesidad, lo que conduce a la resistencia a la insulina a través de varias vías relacionadas. Combinando las características clínicas de la hiperglucemia gestacional y la patogénesis de la resistencia a la insulina, se han desarrollado métodos de inducción dietaria de diabetes gestacional (He *et al.*, 2020).

Durante el establecimiento de modelos animales de diabetes inducida por dieta alta en azúcar y alta en grasas, a los animales experimentales se les da una dieta específica alta en azúcar y alta en grasas para aumentar significativamente los niveles de insulina en ayunas y disminuir su índice de sensibilidad a la insulina, y de ese modo inducir elevada resistencia a la insulina, que es una de las características de la diabetes gestacional. La tasa de éxito de este modelo de ratas preñadas suele ser mayor al 50%, y el nivel de hiperglucemia en sangre de ratas preñadas inducidas por este modelo dietario se detecta a partir del día 17 de preñez, en el último período de la gestación. Además, la inducción de la dieta alta en glucosa y grasa puede conducir a un aumento de la grasa visceral, trastorno del metabolismo lipídico que es una de las características fisiopatológicas importantes de la diabetes gestacional (Ren *et al.*, 2018).

La exposición a una dieta baja en proteínas durante las primeras 3 o 6 semanas de vida en ratas tiene consecuencias en el crecimiento y la respuesta secretora de insulina (Jansson *et al.*, 2006). Durante la gestación, estos animales no pueden satisfacer ni adaptarse a las necesidades de insulina y se vuelven intolerantes a la glucosa. Por lo tanto, la desnutrición proteico-energética temporal en ratas jóvenes reduce la capacidad de aumentar la producción de insulina para satisfacer las necesidades de la preñez. En efecto, los niveles de la glucosa se alteran y junto a otros nutrientes, se transfieren a los fetos en mayores cantidades. Esto estimula el crecimiento de las células β pancreáticas y la secreción de insulina y, por lo tanto, la aparición de macrosomía en la descendencia. La duración de la exposición a la dieta tiene un impacto en el desarrollo y la fisiología del feto. Una dieta restringida a la primera semana de gestación conduce a fetos hipoglucémicos y de bajo peso con un alto riesgo de sufrir DMT2. La dieta restrictiva durante la gestación completa conduce a fetos hiperglucémicos y alteraciones permanentes de las células β , como la reducción del volumen y el contenido de las células β y, en consecuencia, de la capacidad de secreción de insulina (Dumortier *et al.*, 2007).

Modelos inducidos por sustancias químicas

Una gran parte de los modelos experimentales de diabetes se obtienen a través de la administración de estreptozotocina (STZ) (Junod *et al.*, 1969). Dicho fármaco es considerado como el producto químico diabetogénico más potente utilizado en la investigación de la diabetes hasta el momento. Se emplea como análogo citotóxico de la glucosa que tiende a acumularse en las células β -pancreáticas conduciéndolas a la muerte celular. En la dosis apropiada, este fármaco actúa destruyendo selectivamente las células β -pancreáticas. La STZ es un agente genotóxico que causa fragmentación del ADN y daño celular, con la consecuente apoptosis y necrosis de las células. Esta droga, obtenida de *Streptomyces Acharamogenes*, es un análogo estructural de la N-acetil-D-glucosamina con un residuo de la hexosa unido a una N-metil-N-nitrosourea (MNU) (Konrad *et al.*, 2001). Una vez dentro de las células β pancreáticas, la MNU actúa como dador de óxido nítrico intracelular y los elevados niveles de óxido nítrico en concentraciones tóxicas, inhiben a la aconitasa (enzima que protege al ADN mitocondrial de la degradación) conduciendo al daño del ADN. Por otro lado, la MNU de la STZ metila al ADN mitocondrial, lo que conduce a la ruptura de las cadenas de ADN. A su vez, la STZ al ingresar a la célula se degrada y se obtiene un derivado llamado diazometano que actúa como un agente alquilante generando iones de carbonio altamente reactivos llevando a la alquilación del ADN (Szkudelski 2001; Eleazu *et al.*, 2013). La metilación y el daño del ADN inducido por STZ conducen al inicio de los procesos de reparación del ADN, que involucran la activación de la enzima Poli ADP ribosa polimerasa (Cameo *et al.*, 2004) que agota el NAD^+ intracelular y el ATP. Este proceso provoca, por un lado, la activación de la xantina oxidasa (XOD) llevando a un aumento del estrés oxidativo y la posterior muerte celular. Por otro lado, los mecanismos de reparación de ADN sobreestimulados causan la activación sostenida de PARP, agotando las reservas de NAD^+ y ATP, lo que resulta en la inhibición de la síntesis de insulina y en la posterior muerte celular (Goyal *et al.*, 2016).

Una ventaja de la obtención de animales diabéticos mediante la administración de STZ es que puede utilizarse para generar diferentes modelos experimentales de diabetes dependiendo de la edad del animal y la dosis en la que se administre la droga. En ratas,

el modelo más utilizado se obtiene por administración intraperitoneal de STZ (45-70 mg/kg) en animales adultos (que pesan entre 140 a 300 g), disuelta en buffer citrato (Al-Awar *et al.*, 2016). El modelo de diabetes que se obtiene al administrar STZ a una rata adulta reproduce muchas de las características de las pacientes con DMT1 no controlada, tales como hiperglucemia severa e hipoinsulinemia marcada, pérdida de peso, cetoacidosis, polifagia, polidipsia y poliuria, y profundas fallas en el mantenimiento del ciclo estral luego de los 10-15 días subsiguientes a la administración (Junod *et al.*, 1969). Se obtiene, por lo tanto, un modelo severo de diabetes con glucemias mayores a 250 mg/dL que permite estudiar la gestación temprana, malformaciones embrionarias e indagar sobre posibles tratamientos durante este período de la preñez (Higa *et al.*, 2010; Jawerbaum y White 2010).

Por otro lado, es posible obtener un modelo moderado de diabetes mediante la administración subcutánea de STZ en el período neonatal (Jawerbaum y White 2010). En este período, el páncreas neonatal es inmaduro y posee plasticidad y alta capacidad de regeneración de la masa de células β , lo cual permite la regeneración parcial de los islotes luego de la destrucción de las células β -pancreáticas por la administración de la STZ (Portha *et al.*, 1979). Como consecuencia de este tratamiento neonatal se obtienen animales adultos con diabetes moderada, que presentan hiperglucemias que oscilan entre los 150 y los 230 mg/dL, insulinemia ligeramente disminuida y ausencia de cetoacidosis (Portha *et al.*, 1979). Estas ratas son fuertemente intolerantes a la sobrecarga de glucosa, pero no poseen obesidad, hiperinsulinemia, ni marcada resistencia a la insulina. Este modelo permite estudiar el desarrollo feto-placentario y a la descendencia en la diabetes materna dado que la preñez llega a término (Jawerbaum y White 2010).

Alteraciones intrauterinas y programación fetal

En la diabetes materna los fetos se encuentran expuestos a un alterado ambiente intrauterino, conduciendo a un mayor riesgo de una anormal homeostasis de

la glucosa en la vida adulta de la descendencia (Fetita *et al.*, 2006). Actualmente se acepta que un estímulo anormal o "insulto" en el útero tiene la capacidad de alterar el patrón normal del desarrollo fetal, cambiando permanentemente la estructura, fisiología y el metabolismo de su organismo, lo que predispone a enfermedades crónicas en el futuro. Este fenómeno se conoce como "programación fetal" o "programación intrauterina", y es la capacidad que tiene el entorno intrauterino de producir cambios en el feto en desarrollo que serán evidentes a lo largo de la vida del neonato. Existe creciente evidencia que el ambiente intrauterino condiciona el desarrollo fetal y puede predisponer a un mayor riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas en la vida adulta del individuo (Barker y Thornburg 2013).

Desde que se descubrió que el bajo peso al nacer está asociado con un mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico o DM, numerosos estudios epidemiológicos y experimentales han confirmado esta relación (Jornayvaz *et al.*, 2016; Balasuriya *et al.*, 2018). Sin embargo, los mecanismos moleculares específicos a través de los cuales la exposición intrauterina a la hiperglucemia contribuye al desarrollo de obesidad y diabetes en la descendencia aún no están completamente claros. En general, se acepta que la programación fetal resulta de una combinación de mecanismos que afectan a nivel orgánico, tisular, celular y molecular (He *et al.*, 2020).

Se sabe que el desarrollo del páncreas en humanos puede ser especialmente sensible a alteraciones en el entorno de glucosa y aminoácidos, ya que este órgano completa su desarrollo durante la gestación tardía y el período perinatal (Simeoni y Barker 2009; Hales y Barker 2013). Por ejemplo, se ha demostrado que en fetos de ratas cuyas madres presentan hiperglucemia, hay una reducción en la expresión del factor de crecimiento insulínico tipo 2 (IGF2) y una disminución en la masa de células β pancreáticas (Serradas *et al.*, 2002).

El feto depende casi completamente del suministro de glucosa materna para su crecimiento, siendo la glucosa su principal sustrato energético. Dado que la glucosa se transporta fácilmente a través de la placenta, los fetos de madres hiperglucémicas están inevitablemente predestinados a desarrollarse en un entorno con una concentración de glucosa superior a la normal (Simeoni y Barker 2009). Por otro lado, diversos estudios

han demostrado la implicancia de anomalías placentarias en la programación intrauterina (Nugent y Bale 2015). Las placentas de mujeres con diabetes presentan frecuentemente características histológicas alteradas, tales como vellosidades inmaduras, necrosis fibrinoide vellosa, corangiosis y un aumento en la angiogénesis (Jarmuzek *et al.*, 2015).

Investigaciones en modelos experimentales de diabetes durante la preñez han demostrado que la diabetes materna conduce a la programación de anomalías metabólicas en la descendencia. En un modelo murino utilizado en nuestro laboratorio, hemos observado que la diabetes moderada durante la preñez induce el desarrollo de DMT2 en las crías, tanto hembras como machos, a los cinco meses de edad (Capobianco *et al.*, 2015). Además, este modelo induce diabetes gestacional en las crías apareadas con machos sanos a los tres meses de edad (Capobianco *et al.*, 2016).

A pesar de los tratamientos disponibles, las mujeres embarazadas con diabetes pregestacional tienen mayor riesgo de malformaciones congénitas, complicaciones materno-fetales, anomalías placentarias y adversa programación intrauterina (Sugrue y Zera 2018). Las complicaciones durante el embarazo afectan a la madre y al feto a corto y largo plazo. En la diabetes gestacional, las alteraciones feto-placentarias y la programación intrauterina de enfermedades en la vida posterior de la descendencia son similares a los inducidos por la DMT1 y DMT2. Investigaciones en pacientes han encontrado que la descendencia de mujeres con diabetes gestacional presenta una mayor prevalencia de intolerancia a la glucosa, sobrepeso, obesidad, hipertensión y una menor funcionalidad de las células β -pancreáticas, en comparación con la descendencia de mujeres sin diabetes gestacional (Tam *et al.*, 2017; Alejandro *et al.*, 2020).

Tanto la macrosomía como la restricción de crecimiento fetal son marcadores de alterada programación fetal (Figueras y Meler 2022). El grado de daño fetal y de disfunción placentaria y la disponibilidad y utilización de sustratos en el feto, son factores que pueden conducir a la inducción de macrosomía o de restricción del crecimiento intrauterino. En todos los tipos de diabetes materna, tanto el entorno materno como la base genética son importantes en los procesos complejos y

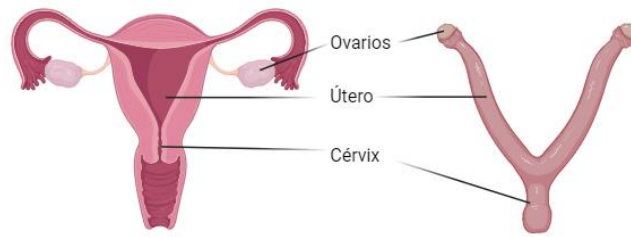
multifactoriales que inducen daño al embrión, la placenta, el feto y la descendencia (Vambergue y Fajardy 2011).

Estos hallazgos, tanto en modelos animales como en humanos, respaldan el concepto del “círculo vicioso de la diabetes”: la diabetes durante el embarazo predispone a la descendencia a la intolerancia a la glucosa, que luego se transmite a las siguientes generaciones (Alejandro *et al.*, 2020; Hivert *et al.*, 2024).

Las mejoras en la práctica clínica y obstétrica han llevado a importantes reducciones en los resultados adversos. La atención preconcepcional para mujeres con diabetes se introdujo hace mucho tiempo y se asocia a mejores resultados del embarazo, si bien se está aún lejos de lograr la prevención de complicaciones inducidas por la diabetes materna, tanto a corto como a largo plazo (Vambergue y Fajardy 2011; Sheiner *et al.*, 2019). La diferente accesibilidad a los sistemas de salud y calidad de atención en los diferentes países y circunstancias, sumado a que se reconoce cada vez más la importancia de otros factores metabólicos que con frecuencia son concurrentes a la diabetes materna, como la obesidad y la hipertrigliceridemia en el embarazo, dificultan la prevención de complicaciones a corto y largo plazo en todos los tipos de diabetes mellitus (Sheiner *et al.*, 2019). También se está lejos aún de comprender en profundidad los mecanismos implicados en la programación fetal. Se requieren más estudios básicos y traslacionales para mejorar la salud de la mujer con diabetes en el corto y largo plazo.

El útero de la rata

El útero es un órgano muscular, hueco, extraperitoneal, situado en la pelvis entre la vejiga y el recto. En la rata, a diferencia de la mujer, adopta una forma bicornes (Esquema 2).



Esquema 2: Esquema comparativo del útero humano y de rata.

El útero de rata puede dividirse histológica y funcionalmente en 3 capas: el endometrio, el miometrio y el perimetrio (**Figura 1**). El endometrio está constituido por un epitelio cilíndrico simple que reviste el lumen del útero. Por debajo de este epitelio y separado por una membrana basal, se localiza una capa de tejido conectivo laxo, muy vascularizada, donde es muy frecuente encontrar infiltración leucocitaria. También pueden observarse glándulas uterinas que son invaginaciones tubulares del epitelio luminal y secretan una variedad de moléculas esenciales para la implantación (Gray *et al.*, 2001). El miometrio, consiste en dos capas de músculo liso, una interna orientada circularmente y una más externa orientada longitudinalmente; y el perimetrio está constituido de tejido conjuntivo laxo, recubierto por la serosa peritoneal. Presenta muchos vasos linfáticos, sanguíneos y fibras nerviosas (Geneser 2000). El cérvix o cuello uterino es un anillo fibroso, situado entre el útero y la vagina. Se encuentra dividido completamente por un septum cervical, que divide al órgano en dos compartimientos que se comunican en sentido craneal con el cuerno uterino correspondiente, mientras que en sentido caudal ambos canales cervicales desembocan en la vagina (el-Banna y Hafez 1972). Desde el punto de vista histológico se puede distinguir el epitelio luminal que sufre cambios graduales en su longitud. En la región próxima a los cuernos uterinos (denominada endocérvis en la mujer), el epitelio del cérvix se presenta cilíndrico simple mientras que en la región próxima a la vagina (exocérvis) su epitelio se vuelve estratificado. Estas modificaciones son más notorias de acuerdo al estadio del ciclo estral, haciéndose más visibles durante el estro. El epitelio se encuentra separado por una membrana basal del estroma cervical compuesto fundamentalmente por tejido conectivo laxo a denso. Por debajo de esta túnica se encuentra, al igual que en el útero, una capa de músculo liso circular y otra dispuesta longitudinalmente. Por último, el cérvix está recubierto por la serosa (el-Banna y Hafez 1972).

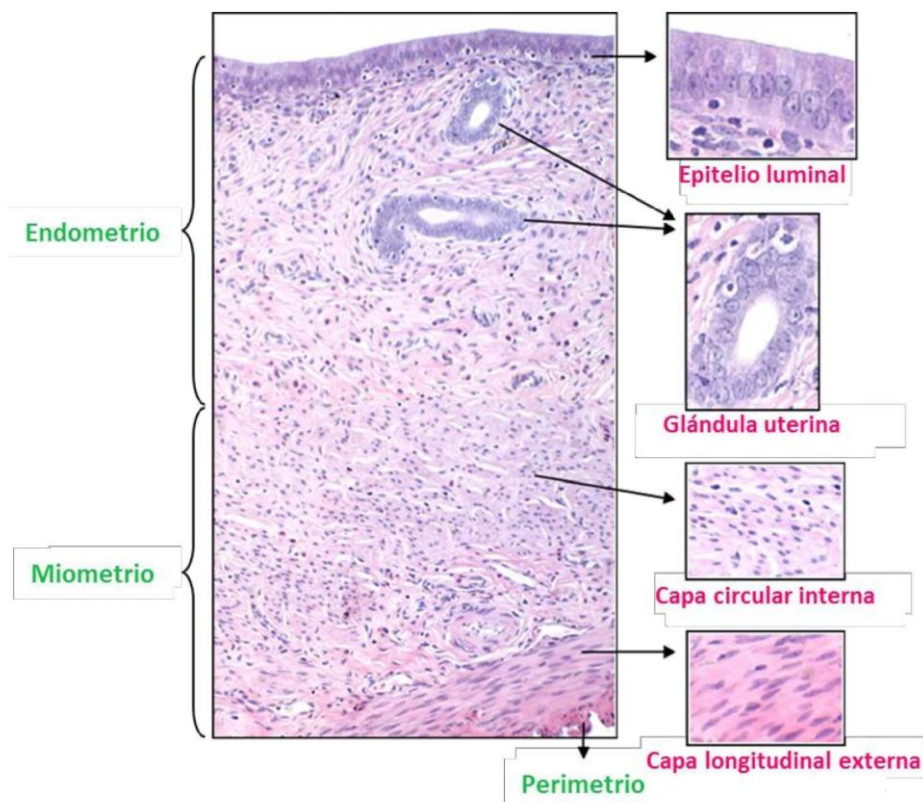


Figura 1: Corte histológico de útero de rata. Coloración Hematoxilina y eosina. Magnificación: 20X (panel izquierdo) y 40X (panel derecho) (Geneser 2000).

El inicio de la pubertad en la rata hembra resulta de una cascada de eventos que comienzan con el establecimiento de un patrón de liberación pulsátil de la hormona luteinizante (LH del inglés) después de la cuarta semana de vida postnatal, ocho o nueve días antes del primer ciclo estral (Westwood 2008). El ciclo estral comprende una serie de eventos hormonales y de comportamientos, altamente sincronizados y que se repiten en el tiempo. El ciclo estral de la rata, a diferencia del ciclo menstrual de la mujer, se caracteriza por la conducta de apareamiento en forma coincidente con la ovulación, asegurando así la oportunidad para la fertilización y la preñez. El ciclo estral de la rata tiene una duración de 4 o 5 días y se da durante todo el año, sin influencias estacionales en las colonias de laboratorio (siempre que los animales se mantengan en un estricto esquema de luz-oscuridad y con control de temperatura) (Ojeda *et al.*, 2010). Los ciclos estrales ocurren desde el comienzo de la pubertad hasta la senescencia y consiste de 4

etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. La duración del proestro es aproximadamente de 12 horas, mientras que el estro presenta un rango de 9 a 15 horas, el metaestro entre 14 y 18 horas, y el diestro tiene una duración de 55 a 72 horas (Lohmiller y Sonya 2006).

El útero, al igual que los ovarios y la vagina, experimenta cambios morfológicos a lo largo del ciclo estral (Westwood 2008). Al comienzo del diestro, el útero es pequeño y carece de una vasculatura muy desarrollada. Está revestido por un epitelio cúbico o columnar bajo, inicialmente hay pocas mitosis y las glándulas son particularmente inactivas. Hacia el final del diestro puede observarse edema del estroma subyacente al epitelio. Durante el proestro, las células del epitelio luminal pasan de ser cúbicas a cilíndricas formando un epitelio columnar simple, hay mitosis frecuentes y la degeneración de las células glandulares y lumbinales es escasa o nula, marcando el final del proestro e inicio del estro, y hay poca infiltración de células inmunes. El estro ocurre generalmente a medianoche y se caracteriza porque el epitelio vaginal alcanza su mayor crecimiento, motivo por el cual se observa una gran población de células epiteliales de descamación, y ausencia de leucocitos. Finalmente, durante el metaestro, el epitelio endometrial muestra continua degeneración y un retorno en la actividad mitótica (Westwood 2008).

Los cambios que experimenta el útero durante el ciclo estral responden a fluctuaciones en los niveles hormonales de 17- β -estradiol (E2) y progesterona, reguladas por las gonadotrofinas LH y FSH secretadas por la hipófisis anterior (Wood *et al.*, 2007). El pico de LH durante el proestro estimula al folículo preovulatorio a ovular y a formar el cuerpo lúteo. Dos picos de FSH periovulatorios estimulan el crecimiento de folículos más pequeños. El primer pico se correlaciona con el de LH y el segundo pulso está asociado con una disminución de la inhibina después de la ovulación. Durante el metaestro el cuerpo lúteo secreta progesterona que decae durante el segundo día del diestro cuando comienzan a aumentar los niveles de estrógenos. El ciclo se completa durante el proestro cuando ocurre el pico de estrógenos que estimula la liberación de gonadotrofinas que llevan a la ovulación (Lohmiller y Sonya 2006).

La gestación en la rata tiene una duración aproximada de 22 días. El establecimiento y mantenimiento de la preñez en la rata involucra dos eventos endocrinos clave. El primero es desencadenado por el apareamiento, en el que la estimulación cervicovaginal desencadena un reflejo neuroendocrino que modifica la liberación de factores hipotalámicos, los que permiten la descarga bifásica (una diurna y otra nocturna) de prolactina hipofisaria. El aumento de prolactina induce la expresión de receptores para LH en las células lúteas que estimula la producción de progesterona necesaria para el mantenimiento de la preñez (Lohmiller y Sonya 2006). El segundo evento endocrino necesario para mantener la preñez es dependiente de la implantación y del desarrollo de un feto normal. En los roedores preñados, las células deciduales del endometrio producen prolactina, de igual secuencia de aminoácidos a la prolactina producida por la hipófisis, que ejerce el efecto luteotrófico necesario para mantener la función del cuerpo lúteo hasta el final de la preñez (Bazer y Spencer 2011).

Una etapa crítica en la preñez es la implantación, una característica de la reproducción de los mamíferos que es el resultado de una compleja serie de pasos interactivos, comenzando con la implantación del blastocisto en el útero y terminando con la formación de una placenta definitiva. El útero responde a un estímulo apropiado, con cambios tanto en el epitelio como en el estroma conduciendo a la decidualización. Esta reacción decidual es una respuesta inflamatoria que involucra una variedad de citocinas que promueven la proliferación y diferenciación celular del compartimiento subepitelial, como así también, al incremento localizado de la permeabilidad vascular (Zhang *et al.*, 2013). Estos eventos están primariamente bajo el control de los esteroides ováricos, estrógenos y progesterona, permitiendo así que el útero sea receptivo y acepte la implantación del blastocisto (Zhang *et al.*, 2013).

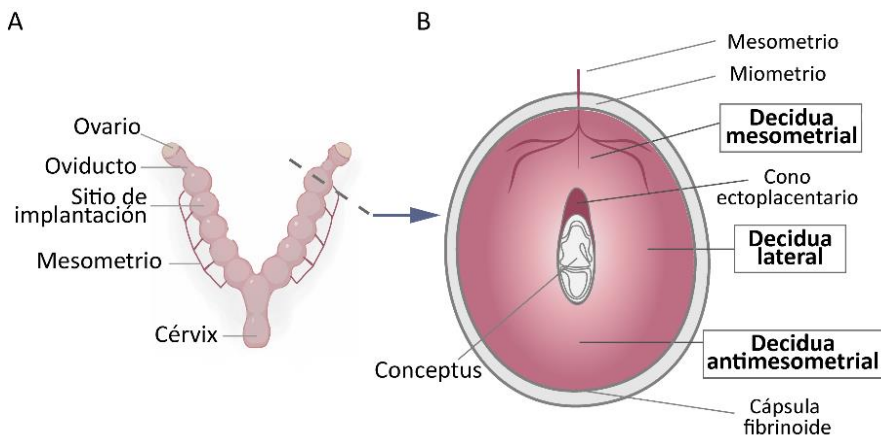
La decidua

La decidua se forma a partir del estroma del endometrio uterino y desempeña funciones esenciales como el soporte físico, el ambiente inmunológico y endocrino adecuado, así como la nutrición necesaria para el desarrollo del embrión antes de que

la placenta sea funcional. Además, la decidua desempeña un papel crucial en la regulación y participación del proceso de placentación (Abrahamsohn y Zorn 1993; Mikhailov 2003; Mori *et al.*, 2016). La decidualización del útero es fundamental para el establecimiento de un embarazo exitoso, dado su rol esencial en el desarrollo embrionario, fetal y placentario (Mori *et al.*, 2016; Ng *et al.*, 2020). La decidualización implica un programa de diferenciación radical de los fibroblastos endometriales con cambios en la morfología celular y la expresión génica.

En humanos, los cambios deciduales se producen en cierta medida en todo el endometrio durante la fase secretora del ciclo menstrual, incluso en la ausencia del embrión, pero alcanzan su plenitud al inicio de la gestación. La decidua consiste de tres regiones diferenciadas anatómica y funcionalmente, definidas en base a su relación con la unidad feto-placentaria. La decidua basal se contacta directamente con la placenta, la decidua capsular cubre al feto en desarrollo a medida que crece y se expande en la cavidad uterina y, por último, la decidua parietal se encuentra en contacto con el útero en la región más distal de la placenta (Ng *et al.*, 2020).

En roedores, en respuesta a la implantación del blastocisto, las células fibroblásticas del endometrio proliferan y se diferencian en células deciduales, formando así la decidua (Abrahamsohn y Zorn 1993; Mikhailov 2003; Mori *et al.*, 2016). Una vez que la decidua está madura, se divide en tres regiones: la decidua antimesometrial, la decidua mesometrial y el área lateral glucogénica de la decidua (**Esquema 3**). Estas regiones se definen en función de su ubicación respecto al mesometrio del útero, que es el mesenterio encargado de sostener e irrigar el útero. La región antimesometrial de la decidua se encuentra en el lado opuesto al mesometrio y es donde ocurre la implantación. Por otro lado, la región mesometrial se sitúa en la parte más cercana al mesometrio, mientras que la región lateral, ubicada entre las regiones antimesometrial y mesometrial, se caracteriza por sus células ricas en glucógeno, lo que le da el nombre de "región de alas glucogénicas" debido a la disposición de estas células en la decidua (Mikhailov 2003; Fonseca *et al.*, 2012). En las ratas, a diferencia de los ratones, también se observa una capa de estroma indiferenciado entre el miometrio y la decidua, conocida como cápsula fibrinoide, la cual está compuesta por fibroblastos (**Esquema 3**) (Abrahamsohn y Zorn 1993).



Esquema 3. Regiones de la decidua en la gestación de la rata. **A.** Útero bicornal en el día 9 de gestación de la rata mostrando la ubicación del mesometrio, los sitios de implantación, ovarios y oviductos. **B.** Regiones de la decidua en el día 9 de gestación de la rata en cada sitio de implantación rodeando al conceptus: decidua mesometrial, decidua lateral y decidua antimesometrial.

Las células deciduales son células poliploides grandes, redondas y multinucleadas, ricas en glucógeno y lípidos, y producen una variedad de marcadores funcionales como la prolactina y las proteínas de su familia relacionadas, como también las proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBPs). El embrión de rata en estadio de blastocisto se adhiere al lumen uterino en el día 6 de gestación, y la zona decidual primaria se establece inmediatamente en la capa endometrial más cercana al embrión implantado (Mori *et al.*, 2016). Se considera que ésta zona es el primer andamiaje protector del crecimiento embrionario con una composición celular avascular y estrecha (Parr y Parr 1986). Hacia el día 6,5 la zona decidual primaria se completa, mientras que la zona decidual secundaria, que rodea al embrión y a la zona decidual primaria, se está desarrollando, dando lugar a la diferenciación terminal de las células estromales deciduales, comenzando desde la región antimesometrial hacia la mesometrial con vasculatura grande y bien dilatada.

La decidua contiene una gran cantidad de células inmunes maternas, que establecen el equilibrio entre la defensa contra los patógenos y la tolerancia del embrión. Las poblaciones principales incluyen células inmunes innatas, como células natural killer uterinas (uNK) y macrófagos. Sin embargo, no se pueden ignorar pequeñas poblaciones de células madre inmunitarias y células inmunes adaptativas. Además, es

importante para la futura salud materna y fetal que la decidua que contiene el embrión pueda proporcionar respuestas protectoras contra los patógenos, sin una inflamación excesiva o que dañe al embrión en desarrollo (Mori *et al.*, 2016).

El proceso de diferenciación de la decidua está regulado por hormonas, principalmente los estrógenos y la progesterona. En la preñez, en roedores como la rata y el ratón, se produce un pico de estrógenos antes de la implantación, lo cual es esencial tanto para iniciar la implantación como para desencadenar la reacción decidual. Posteriormente, los niveles de estrógenos se mantienen bajos hasta los días 15-16 de la gestación, cuando alcanzan valores similares a los de la fase lútea. La progesterona, por su parte, experimenta cambios dinámicos. El primer pico de esta hormona ocurre entre los días 4 y 5 de preñez, seguido de una estabilización de los niveles sanguíneos entre los días 9 y 12. Hacia los días 15-16, se observa un segundo pico de progesterona, y finalmente, los niveles de esta hormona disminuyen significativamente en el momento del parto (Mikhailov 2003). Estas fluctuaciones en los niveles hormonales acompañan los procesos de proliferación y apoptosis en la decidua.

La prolactina es una de las principales proteínas sintetizadas y secretadas durante la decidualización del estroma endometrial (Maslar y Riddick 1979). Se clasifica como una hormona inmunoneuroendocrina con función autocrina/paracrina que regula más de 300 funciones biológicas, incluyendo la regulación inmunitaria, el metabolismo, la angiogénesis y la osmorregulación (Freeman *et al.*, 2000). Además, la prolactina desempeña un papel esencial en los procesos reproductivos, como la producción de esteroides sexuales, mantenimiento del cuerpo lúteo, la implantación de blastocistos, la placentación y la lactancia (Reese *et al.*, 2000).

Estudios pioneros han demostrado que las hembras de ratones *knockout* para prolactina (PRL-KO) tienen ciclos estrales irregulares y no quedan preñadas cuando se aparean con machos fértiles. Si bien ocurre la fecundación, la implantación no puede lograrse (Horseman *et al.*, 1997). De manera similar, ratones *knockout* para el receptor de prolactina (RPRL-KO) han demostrado que las hembras tampoco logran la preñez porque tienen múltiples defectos reproductivos antes de la implantación, lo que explica la baja supervivencia de los embriones (Ormandy *et al.*, 1997). Además, los ratones PRL-

KO y PRLR-KO son completamente infértiles porque el cuerpo lúteo depende de la secreción de prolactina para inducir la síntesis de progesterona y la vascularización endometrial para la implantación (Ormandy *et al.*, 1997).

Los reguladores clásicos de la síntesis de prolactina hipofisaria son la dopamina, la hormona liberadora de tirotropina y la prolactina hipofisaria *per se* (Marano y Ben-Jonathan 2014). Por su parte, la síntesis y secreción extrahipofisaria dependen principalmente del tipo de célula de origen y su microambiente asociado. En la decidua, la progesterona es la reguladora primaria de la liberación de prolactina (Zinger *et al.*, 2003). Además, se conoce también que el calcitriol influye en la producción de prolactina en la decidua (Diaz *et al.*, 2011). Por el contrario, la expresión de prolactina decidual es inhibida por diferentes citocinas inflamatorias, como la interleuquina (IL-2) y TNF- α , así como por factores con propiedades antiinflamatorias como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Kanda *et al.*, 1999; Kane *et al.*, 2010).

La regulación transcripcional de prolactina está controlada por dos promotores, uno proximal asociado con la expresión hipofisaria y uno distal asociado con la expresión extrahipofisaria. En particular, la activación de la vía AMPc/PKA induce la actividad del promotor de prolactina extrahipofisaria en células deciduales humanas a través de los factores de transcripción CREB y C/EBP (Christian *et al.*, 2002).

La prolactina decidual tiene un efecto autocrino y regula las funciones hormonales, inmunológicas y de protección de la decidua. Por ejemplo, la prolactina afecta significativamente la regresión de la decidua, un evento fundamental que ocurre a través de la apoptosis al final de la gestación (Dai *et al.*, 2000). Además, esta hormona inhibe la producción de IL-6 decidual, una señal proinflamatoria crítica en la interfaz feto-materna, y la producción de 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa (20 α -HSD), previniendo el catabolismo de la progesterona (Bao *et al.*, 2007). Además, la prolactina fetal se asocia con la condrogénesis temprana y el desarrollo del sistema nervioso central; también participa en el desarrollo del órgano pancreático antes y después del nacimiento (Auffret *et al.*, 2013).

Por otro lado, la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4) se expresa constitutivamente en la célula epitelial endometrial y regula la proliferación y la supervivencia, la migración y la invasión de la célula epitelial endometrial (Zhu *et al.*, 2015). FABP4 pertenece a la familia FABP de proteínas citosólicas altamente homólogas que unen una variedad de ligandos hidrofóbicos, como ácidos grasos de cadena larga, eicosanoides, leucotrienos y prostaglandinas, y es fundamental para algunos procesos celulares, como la captación y el tráfico de ácidos grasos y la regulación de la expresión génica (Kralisch y Fasshauer 2013). La expresión de FABP4 en la decidua se ve potenciada por el estrógeno y aún más por la combinación de estrógeno y progesterona (Tian *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2015). La sobreexpresión de FABP4 estimula la decidualización, mientras que su inhibición mediante ARNi o inhibidores específicos reduce la decidualización, considerándose a FABP4 como un posible marcador de decidualización (Tian *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que FABP4 se expresa en la zona decidual primaria en los días 5 y 6 de gestación y se incrementa notablemente en los días 7 y 8, sugiriendo un papel clave en la decidualización y siendo partícipe clave del proceso de implantación (Tian *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017).

Para estudiar la decidualización en modelos animales sin la presencia de un embrión, se puede inducir la pseudopreñez, que es un estado fisiológico en el que el útero adquiere características propias de una implantación embrionaria, en ausencia de la fecundación. La forma más común de inducirla es mediante estimulación cervical, ya sea a través del coito con un macho vasectomizado (Pal *et al.*, 1999), o alternativamente, mediante estimulación artificial con vibración sónica (Kaneko *et al.*, 2020). El estímulo mecánico sobre el cuello uterino desencadena la liberación de prolactina, hormona clave en la mantención del cuerpo lúteo y la producción de progesterona, ambas esenciales para la diferenciación del endometrio (Hirota 2019).

Alternativamente, la pseudopreñez también puede inducirse mediante la administración exógena de estrógenos y progesterona en concentraciones específicas. Este enfoque permite estudiar la decidualización uterina bajo condiciones hormonales controladas, incluso en hembras prepúberes, evitando así la influencia de las fluctuaciones hormonales del ciclo estral. Mayormente, se utiliza la inyección

intraperitoneal de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) y gonadotropina coriónica humana (hCG) (Mukumoto *et al.*, 1995; Cornejo-Cortes *et al.*, 2006), aunque también suele utilizarse la inyección de antisuero anti-inhibina (Ishigame *et al.*, 2004). Entre estos métodos, el tratamiento con PMSG/hCG se utiliza ampliamente como un método simple y eficaz para inducir la superovulación y/o pseudopreñez en ratas jóvenes y adultas (Sotomaru *et al.*, 2005). El tratamiento con PMSG en ratas inmaduras tiene varios efectos significativos, como aumento notable de peso de ovarios y útero en comparación con las ratas no tratadas. Además, incremento de niveles plasmáticos hormonales de hormona LH, FSH y prolactina. También, se produce la liberación de ovocitos intraováricos principalmente debido a la ruptura de folículos antrales y preovulatorios y se desarrollan los folículos preovulatorios, induciendo de esta manera a la ovulación (Cornejo-Cortes *et al.*, 2006).

El útero y la decidua en la diabetes materna

Aunque la diabetes gestacional se diagnostica durante el embarazo, cada vez hay más pruebas de que los factores previos al embarazo contribuyen al desarrollo de la misma (Deshpande *et al.*, 2023; Thaweethai *et al.*, 2023; Hivert *et al.*, 2024). Por lo tanto, antes del diagnóstico de la diabetes gestacional, estos factores previos al embarazo podrían influir negativamente en el desarrollo temprano del embrión y la placenta, condicionando la salud tanto del feto como de la madre. En las primeras fases del embarazo, la decidua desempeña un papel crucial a la hora de proporcionar el entorno adecuado y los nutrientes necesarios para el desarrollo (Jones *et al.*, 2015; Burton *et al.*, 2020). Los fallos en este proceso pueden dar lugar a una serie de resultados adversos, como abortos espontáneos y malformaciones embrionarias, y además pueden provocar alteraciones en la placenta y el desarrollo fetal, que a su vez pueden programar enfermedades en la descendencia (Roberti *et al.*, 2023; Hivert *et al.*, 2024).

El endometrio decidualizado exhibe un fenotipo biosintético y secretor distintivo, que desempeña un papel fundamental en su función histotrófica y en la regulación de la invasión de trofoblastos, procesos esenciales para el correcto desarrollo del embrión

postimplantación y de la placenta (Okada *et al.*, 2018; Burton *et al.*, 2020; Hivert *et al.*, 2024).

Nuestros estudios en modelos experimentales de diabetes pregestacional han mostrado alteraciones inducidas en el útero de ratas no preñadas (Jawerbaum *et al.* 1995), en ratas en período de organogénesis temprana (Higa *et al.*, 2011), en período de post-placentación (Roberti *et al.*, 2018) y en la gestación a término (Jawerbaum *et al.*, 1998).

La programación fetal de enfermedades metabólicas y cardiovasculares es una característica distintiva tanto de la diabetes pregestacional como de la diabetes gestacional; sin embargo, la programación fetal de alteraciones reproductivas inducidas por la diabetes materna ha sido aún poco estudiada (Jawerbaum y White 2017; Hufnagel *et al.*, 2022).

Entorno prooxidante y proinflamatorio

El estrés oxidativo es un proceso complejo que se da por la generación excesiva de radicales libres, también conocidos como especies reactivas de oxígeno (ROS). A pesar de tener una vida media corta, las ROS inician la peroxidación lipídica de las membranas biológicas y, por lo tanto, producen compuestos de toxicidad diversa como el malondialdehído, hexanal y, el 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), de interés en este trabajo. La peroxidación lipídica puede tener efectos nocivos sobre las funciones celulares, afectar la fluidez, permeabilidad y/o potenciales de membrana (Dham *et al.*, 2021).

Por otro lado, 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 formas: 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 metaloproteínas que eliminan el O_2^- . 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. Cuando la homeostasis de óxido-reducción (balance entre prooxidantes y antioxidantes) de un sistema biológico se encuentra alterada, se evidencia un entorno prooxidante.

En trabajos previos, se identificó un entorno prooxidante en la placenta tanto en modelos animales de diabetes y preñez como en la gestación de pacientes con diabetes (Lappas *et al.*, 2011; Capobianco *et al.*, 2018b). El entorno prooxidante placentario durante la diabetes pareciera estar relacionado con una incrementada producción de especies reactivas de oxígeno y la disminución en la actividad antioxidante placentaria (Hussain *et al.*, 2021). En un modelo murino de diabetes y preñez se han evidenciado bajos niveles placentarios de la enzima antioxidante superóxido dismutasa, posiblemente vinculados con la nitración de la misma (White *et al.*, 2010). Además, estudios en modelos animales mostraron elevados niveles de marcadores de lipoperoxidación como sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS), isoprostranos y 4-HNE a nivel embrionario y en diversos órganos del feto, como corazón, placenta y pulmón (Martinez *et al.*, 2011; Kurtz *et al.*, 2012; Higa *et al.*, 2017).

Se reconoce en las mujeres con diabetes gestacional la presencia de un entorno proinflamatorio incrementado, conociéndose el vínculo entre la hiperglucemia, la insulino resistencia y la inducción de la producción de citocinas y otros marcadores proinflamatorios (Khambule y George 2019).

Las reacciones proinflamatorias relacionadas con el embarazo cumplen una doble función: favorecen la progresión saludable del embarazo y contribuyen a la patología en casos de desregulación. La inflamación controlada es vital para la formación de la placenta y la implantación del embrión al principio del embarazo. Las células inmunitarias liberan citocinas y quimiocinas que facilitan la invasión de las células del

trofoblasto y la remodelación de las arterias espiraladas de la madre, ambas esenciales para una perfusión placentaria adecuada. Durante el embarazo, se establece un entorno regulador para proteger al feto de una respuesta exagerada del sistema inmunitario de la madre. Sin embargo, un desequilibrio en los factores proinflamatorios y antiinflamatorios puede provocar complicaciones como parto prematuro, diabetes gestacional y preeclampsia (Mor y Cardenas 2010). La composición y estructura celular únicas de la placenta, incluidas las células del trofoblasto, son esenciales para sus funciones inmunomoduladoras (Maltepe *et al.*, 2010; Favaro *et al.*, 2021).

Múltiples estudios han demostrado consistentemente la función de los factores proinflamatorios en el desarrollo de la resistencia a la insulina (Shamsad *et al.*, 2023). El tejido placentario posee funciones endocrinas robustas, capaces de producir y liberar una amplia gama de citocinas proinflamatorias que exacerban la insulinoresistencia materna y la respuesta proinflamatoria crónica. Entre estos factores proinflamatorios se encuentran TNF- α , IL-6, IL-8, e IL-1 β , que son secretados por el tejido placentario. IL-1 β , como citocina proinflamatoria, induce la apoptosis en las células β de los islotes y activa la vía NF- κ B, lo que conduce a la liberación de IL-6, IL-8 y otros factores proinflamatorios (Pantham *et al.*, 2015). IL-6 e IL-8, a su vez, estimulan varias células linfoides e inflamatorias, intensificando aún más la respuesta proinflamatoria. Además, el TNF- α se reconoce como un factor de riesgo independiente para la diabetes gestacional debido a su capacidad para reducir la transmisión de la señal de insulina y el transporte de glucosa (Pantham *et al.*, 2015).

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR)

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR, siglas en inglés) son factores de transcripción activados por ligando que regulan la expresión de múltiples genes involucrados en procesos metabólicos, antiinflamatorios y de desarrollo (Bensinger y Tontonoz 2008). En la diabetes materna, el exceso de glucosa y otros sustratos metabólicos, como los lípidos en la circulación materna, llegan a los tejidos

intrauterinos y generan un entorno proinflamatorio que altera el desarrollo embrionario, fetal y placentario (Jawerbaum y Gonzalez 2006; Lappas *et al.*, 2011). En este contexto, los PPAR surgen como reguladores de las vías de señalización que podrían ayudar a prevenir alteraciones en el desarrollo intrauterino inducidas por la diabetes materna (Jawerbaum y Capobianco 2011).

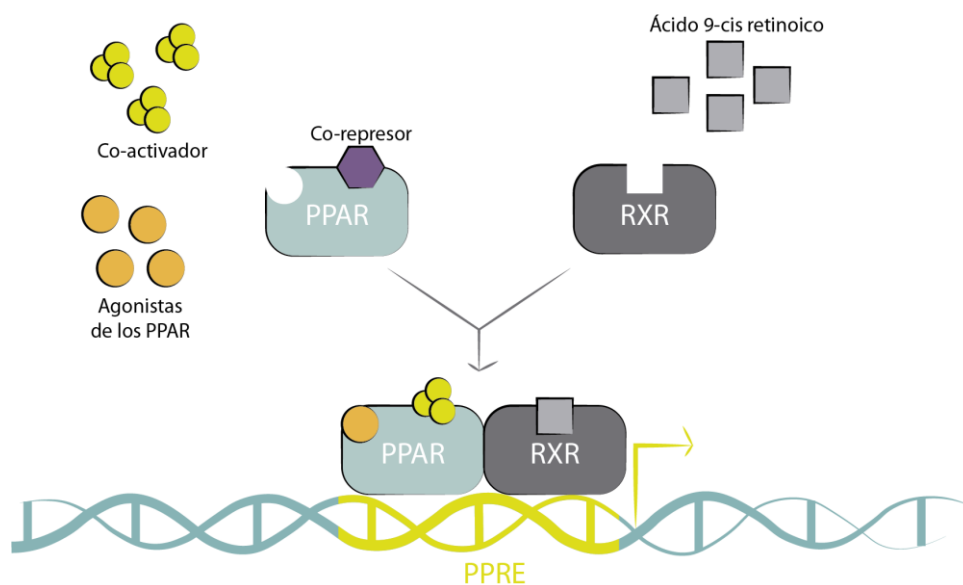
Se denominó PPAR α al primer miembro de esta familia de receptores identificado. Poco después, PPAR δ y PPAR γ fueron identificados por compartir una significativa homología de secuencia con PPAR α , pero estos últimos no estaban involucrados en la proliferación de los peroxisomas (Xu *et al.*, 2001). Los PPAR actúan como factores de transcripción que pueden ser activados por ligandos naturales o sintéticos y controlan importantes procesos fisiológicos, incluyendo el metabolismo de lípidos, la homeostasis energética, la inflamación, la diferenciación y proliferación celular y procesos reproductivos y del desarrollo (Takada y Makishima 2020). Existen tres isoformas de los PPAR codificados por genes diferentes localizados en distintos cromosomas: PPAR α (también llamado NR1C1, ubicado en el cromosoma 22 en la región 22q13.31 en humanos (Ricote y Glass 2007), PPAR δ (también llamado PPAR β y NR1C2, ubicado en el cromosoma 6 en la región 6p21.1-p21.2 en humanos) (Yoshikawa *et al.*, 1996) y PPAR γ (también llamado NR1C3, ubicado en el cromosoma 3 en la región 3p25.2 en humanos (Beamer *et al.*, 1997). Cada una de las isoformas se encuentra expresada diferencialmente en los tejidos donde ejercen su función específica. De esta manera, PPAR α se encuentra altamente expresado en tejidos que realizan la oxidación de ácidos grasos y se ha demostrado que es un regulador importante de la β -oxidación de ácidos grasos, el transporte de ácidos grasos y la síntesis de lipoproteínas (Bougarne *et al.*, 2018). También se ha reportado que la activación de PPAR α está involucrada en respuestas antiinflamatorias (Bougarne *et al.*, 2018). A su vez, PPAR δ se encuentra expresado en la mayoría de los tejidos con diferencias en los niveles de expresión dependiente del tipo celular (Higashiyama *et al.*, 2007). Se conoce que PPAR δ está involucrado en diversos procesos de diferenciación y proliferación celular, además de ser un regulador de la homeostasis energética y presentar propiedades antiinflamatorias (Fredenrich y Grimaldi 2005; Moraes *et al.*, 2006). Por último, debido al uso de un promotor diferencial en la secuencia génica y por mecanismos de *splicing*

alternativo, PPAR γ presenta dos isoformas de la proteína, PPAR γ -1 y PPAR γ -2, teniendo esta última 30 aminoácidos adicionales en su extremo N-terminal (Ahmadian *et al.*, 2013). PPAR γ se encuentra predominantemente expresado en el tejido adiposo como regulador de la diferenciación de adipocitos y del almacenamiento de triglicéridos (Janani y Ranjitha Kumari 2015). También se expresa en células del sistema inmune (monocitos, macrófagos, placas de Peyer del tracto digestivo), en el bazo, en el colon y en los trofoblastos placentarios (Barak *et al.*, 1999). Se ha observado que la activación de este receptor nuclear induce claros efectos antiinflamatorios y que también se encuentra involucrado en diversos procesos de diferenciación celular (Janani y Ranjitha Kumari 2015).

En cada uno de sus sitios de acción, los PPAR actúan como factores de transcripción, al heterodimerizar con el receptor de ácido retinoico (RXR), cuyo ligando es el ácido 9-cis retinoico (**Esquema 4**). El heterodímero conformado por una de las isoformas de los PPAR y el RXR se une al elemento de respuesta a proliferadores peroxisomales (PPRE), ubicada en la región promotora de los genes blanco de los PPAR (Lamas Bervejillo y Ferreira 2019). Al ser activados, los PPAR regulan a través de la unión al PPRE la expresión de estos genes involucrados en los procesos fisiológicos en los cuales intervienen los PPAR, incluyendo la regulación de procesos metabólicos, prooxidantes, proinflamatorios, de diferenciación celular, de apoptosis, de homeostasis lipídica, entre otro (Takada y Makishima 2020). Los PPRE consisten en dos hexanucleótidos con la secuencia consenso AGGTCA separados por un único espaciador de nucleótidos (Desvergne *et al.*, 2006).

La unión del heterodímero PPAR-RXR al PPRE es necesaria pero no suficiente para la actividad transcripcional (Lamas Bervejillo y Ferreira 2019). Se han identificado diferentes proteínas co-activadoras y co-represoras que median la capacidad de los PPAR para activar o reprimir el proceso de transcripción. Los co-activadores interactúan con los PPAR de manera dependiente de los agonistas, a través de un motivo LXXLL conservado (donde X implica cualquier aminoácido). Varios co-activadores, incluidos CBP/p300 y el co-activador del receptor de esteroides 1 (SRC1), poseen actividad de histona acetilasa, de manera que pueden remodelar la estructura de la cromatina y habilitar la transcripción. Un segundo grupo, representado por los miembros del

complejo DRIP/TRAP, como la proteína de unión a PPAR (PBP)/TRAP220, actúa formando un puente entre el receptor nuclear y la maquinaria de iniciación de la transcripción. PGC-1 α pertenece a una familia de co-activadores altamente sensible a los estímulos ambientales y estados nutricionales de un organismo. Los co-activadores transcripcionales son multifuncionales y actúan como "interruptores moleculares" en muchas vías metabólicas (Liu y Lin 2011). La unión de co-activadores y la liberación de co-represores, eventos que permiten la activación de los PPAR, son dependientes de la unión del ligando, el cual se une al heterodímero PPAR/RXR e induce un cambio conformacional en la estructura proteica, iniciando los eventos necesarios para que ocurra la transcripción.



Esquema 4: Mecanismo clásico de acción de los PPAR. El heterodímero PPAR-RXR se une a las regiones PPRE localizadas en el promotor de genes blanco. La unión del agonista induce un cambio conformacional en el PPAR que permite su disociación de factores co-represores y el reclutamiento de factores co-activadores que activan la transcripción génica.

De esta manera, la actividad de los PPAR puede ser regulada por la unión a ligandos ya sean de origen natural o farmacológico (Berger y Moller 2002). Entre los ligandos endógenos de los PPAR se encuentran ciertos ácidos grasos mayormente insaturados y ciertos eicosanoides (metabolitos del ácido araquidónico) que activan en forma diferencial a las diferentes isoformas de los PPAR (Bordoni *et al.*, 2006; Jawerbaum y Gonzalez 2006). PPAR α puede ser activado por ácidos grasos insaturados

de cadena larga (como el ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido docosahexaenoico y ácido eicosaenoico y ácido oleico) y por eicosanoides como HETE y el leucotrieno B₄ (Hihi *et al.*, 2002; Pawlak *et al.*, 2015). Los fibratos son ligandos farmacológicos de PPAR α y son empleados para mejorar el perfil lipídico en pacientes con hiperlipidemia y con síndrome metabólico (Desvergne *et al.*, 2006). Los ligandos endógenos de PPAR δ son la prostaciclina (PGI₂), así como también varios ácidos grasos insaturados como el ácido araquidónico, el ácido linoleico y ácido oleico, entre otros (Hihi *et al.*, 2002). Los fármacos desarrollados, carbaprostaciclina (cPGI₂) e iloprost, son mayormente utilizados como análogos de la acción de la PGI₂ y poseen acción a nivel del receptor de membrana para PGI₂ y como ligando de PPAR δ (Kersten y Wahli 2000). PPAR γ es activado por prostaglandinas derivadas de la PGD₂, siendo su metabolito final 15-deoxy- Δ 12,14-Prostaglandina J₂ (15dPGJ₂) el derivado que se une con mayor afinidad al dominio de unión al ligando y activa PPAR γ (Forman *et al.*, 1995). También los eicosanoides 9-HODE, 13-HODE y 15-HETE, han sido identificados como ligandos de PPAR γ (Nagy *et al.*, 1998). Además, distintos ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados son activadores de PPAR γ , incluyendo el ácido oleico, el ácido linoleico y el ácido linolénico (Hihi *et al.*, 2002). La acción de los distintos ligandos de cada isoforma de los PPAR es diferencial, ya que varían los co-activadores que se reclutan en presencia de diferentes agonistas de mismo receptor, los cuales también tienen un rol fundamental en la actividad de los PPAR (Desvergne *et al.*, 2006).

Además del mecanismo de acción de los PPAR dependiente de PPRE, existen otros mecanismos independientes de la unión al sitio PPRE dado que la activación de PPAR puede desencadenar indirectamente efectos represivos al interferir con factores de transcripción, tales como NF- κ B, AP-1 y STAT. Estos mecanismos de acción se denominan de forma general como mecanismos de transrepresión (Lamas Bervejillo y Ferreira 2019). Dentro de los mecanismos de transrepresión, pueden describirse tres formas de acción de los PPAR: de “anclaje”, de “silenciamiento” y de “silenciamiento inverso”. La primera consiste en el secuestro de factores de transcripción, la segunda en el secuestro de cofactores necesarios para la transcripción y la tercera en la disociación de co-represores que se encontraban unidos a la proteína de los PPAR y al ser liberados

reprimen la actividad transcripcional de otros factores de transcripción (Lamas Bervejillo y Ferreira 2019).

Sumada a la regulación de los PPAR a través de ligandos, co-activadores y co-represores, los mismos pueden sufrir modificaciones post-traduccionales que regulan la actividad de los PPAR, tales como la fosforilación, que puede cambiar la afinidad del receptor por el ligando, la dimerización o la unión al ADN; por ejemplo, la insulina activa a PPAR α por fosforilación del dominio AF-1 vía MAP quinasa (Juge-Aubry *et al.*, 1999). También la degradación de los PPAR es regulada por su ubiquitinización, las tiazolidinedionas son capaces de inducir la ubiquitinización de PPAR γ , y subsecuentemente la degradación del mismo por proteosomas (Hauser *et al.*, 2000). Por otro lado, los fibratos inhiben la ubiquitinización de PPAR α y de esta manera incrementan su vida media (Hirotsu *et al.*, 2001; Blanquart *et al.*, 2002).

Por último, los PPAR pueden ser regulados de manera epigenética a través de la metilación del ADN en regiones específicas de sus genes, como por ejemplo la metilación del promotor de PPAR α , que está incrementada en oocitos de la descendencia de ratonas obesas induciendo la inhibición de PPAR α , o la metilación de la región 437CpG en el gen de PPAR γ , que se encontró reducida en tejido adiposo de ratones obesos, induciendo la activación de PPAR γ (Ou *et al.*, 2019). A su vez, los microRNAs tienen un papel crucial como reguladores epigenéticos en la expresión y actividad de las tres isoformas de los PPAR (Zhang *et al.*, 2018). Se han descrito varios microRNAs que pueden o bien unirse directamente al ARNm de los PPAR o indirectamente afectar su expresión o actividad a través de los cofactores y co-represores asociados a los PPAR. Estos microRNAs son específicos para distintos órganos y, por lo general, para cada una de las isoformas de los PPAR, aunque puede haber un mismo microRNA que regule a más de una isoforma. Los microRNAs que regulan a los PPAR, al igual que todos los microRNAs, pueden verse afectados en patologías metabólicas, patologías cardiovasculares y cáncer, entre otras enfermedades (Portius *et al.*, 2017). De esta manera, es importante destacar la complejidad de la regulación de la vía de los PPAR y el gran número de agentes, tales como ligandos, co-activadores, co-represores,

microRNAs y otros reguladores postranscripcionales, entre otros, que intervienen en la actividad de estos receptores nucleares como factores de transcripción.

Participación de la vía de los PPAR en la gestación

Dentro de las vías de señalización reguladas por nutrientes, la vía de los PPAR desempeña un papel central tanto en la homeostasis energética como en la reproducción. Los PPAR se expresan funcionalmente en diferentes órganos que intervienen en la función reproductiva, tales como el hipotálamo, la glándula pituitaria, el ovario, el útero y la placenta (Nishimura *et al.*, 2011). En el ovario, PPAR γ se expresa en las células de la granulosa y de forma más débil en las células tecaes donde se observa mayor expresión de PPAR δ y PPAR α (Komar *et al.*, 2001). En la placenta de roedores y humanos, las tres isoformas de los PPAR muestran, diferentes perfiles de expresión a lo largo de la gestación, desempeñando funciones importantes durante el crecimiento y la maduración de la placenta funcional (Nishimura *et al.*, 2011). En las células trofoblásticas, las tres isoformas de PPAR se encuentran presentes y ejercen funciones críticas en el desarrollo y la función de la placenta (Barak *et al.*, 2008). PPAR α se expresa mayormente en la zona de unión y del laberinto de la placenta de rata y en los trofoblastos de las vellosidades de la placenta humana (Wang *et al.*, 2002). Se postula su función en la regulación de la transferencia lipídica materno-fetal, y en la utilización de lípidos placentarios y fetales (Xu *et al.*, 2007). Los ratones PPAR δ -/- poseen alteraciones morfológicas en la placenta como una pérdida del contacto placentodecidual, posiblemente relacionado con un desbalance en la remodelación de la matriz extracelular (Barak *et al.*, 2002). Debido a estas fallas en la placentación, la mayoría de los embriones muere durante la organogénesis, mientras que aquellos que resultan viables luego de esta etapa presentan retraso de crecimiento, una reducción del tejido graso abdominal y alteraciones en el desarrollo neuronal (Barak *et al.*, 2002). A su vez, PPAR δ está involucrado en la diferenciación y maduración de los trofoblastos (Barak *et al.*, 1999). En ratones se ha observado que embriones nulos para PPAR γ presentan alteraciones en la diferenciación de los trofoblastos y la vascularización de la placenta, afecciones que llevan a un adelgazamiento severo del miocardio y la muerte del embrión

hacia el día 10 de preñez (Barak *et al.*, 1999). Además, la activación de PPAR γ regula procesos de síntesis y utilización de lípidos en la placenta de rata, lo que sugiere un importante rol de este receptor en cuanto a la provisión de los nutrientes necesarios para el desarrollo fetal (Higa y Jawerbaum 2013). En la gestación a término en humanos, la expresión de PPAR α , PPAR γ y PPAR δ se ha observado en estructuras como el amnios, la coriodecidua y la placenta (Marvin *et al.*, 2000; Berry *et al.*, 2003). Los niveles de PPAR α y PPAR δ , se incrementan en la placenta a término (Berry *et al.*, 2003), mientras que los niveles de PPAR γ disminuyen, probablemente debido a su capacidad de inhibir la formación de prostaglandinas requeridas durante el proceso de parto, ya que en forma simultánea se observan incrementos en la expresión de COX-2 (Dunn-Albanese *et al.*, 2004).

En comparación con la extensa investigación sobre los PPAR en la placenta, los estudios sobre la expresión y la función de los PPAR en el útero antes del establecimiento de la placenta son escasos. Se sugiere que los PPAR pueden desempeñar diversas funciones importantes antes de la placentación en el endometrio durante la gestación temprana (Nishimura *et al.*, 2011). En particular, PPAR δ se expresa fuertemente durante la decidualización, evidenciándose en ratones PPAR δ -/- alteraciones en la implantación, decidualización y placentación (Wang *et al.*, 2007a). En cuanto a los patrones de expresión de PPAR α y PPAR δ durante el proceso de decidualización, se ha observado que se expresan constantemente en el epitelio glandular en el período preimplantatorio en la gestación de ratas, mientras que ambos PPAR se detectaron fuertemente expresados en el estroma endometrial entre los días 4 y 6 de gestación, correspondientes al período periimplantatorio (Nishimura *et al.*, 2011). A su vez, se conoce que PPAR α puede unirse a elementos de respuesta a estrógenos y actuar como un inhibidor competitivo del receptor de estrógeno. En roedores, el pico preimplantatorio de estrógenos es necesario para que la implantación sea exitosa. Por lo tanto, PPAR α podría estar asociado con la regulación de la función estrogénica durante la implantación. PPAR α es esencial en etapas muy tempranas de la decidualización del estroma, regulando la diferenciación de las células estromales en células deciduales. En cuanto a PPAR γ , se expresa fuertemente durante la fecundación y su expresión disminuye durante el período de implantación. De esta manera, los tres

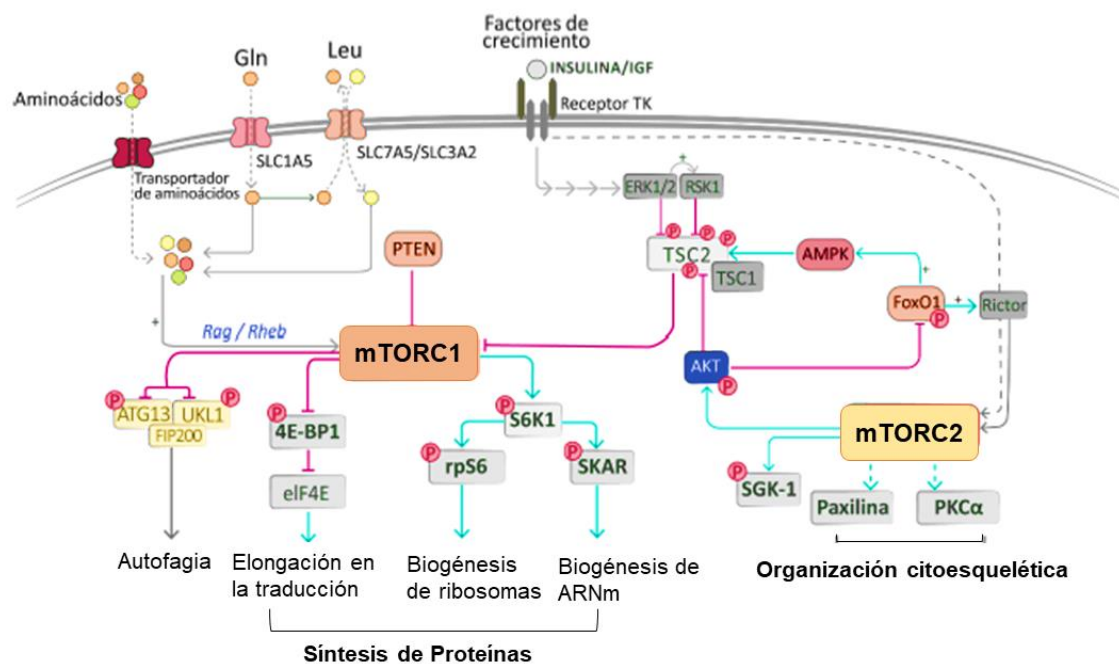
isotipos de los PPAR se expresan en el útero de la rata durante la gestación temprana y cumplen funciones importantes durante la implantación o decidualización (Nishimura *et al.*, 2011).

Estudios realizados en nuestro laboratorio evidencian alteraciones en la expresión de los PPAR tanto a nivel fetal como en la placenta de ratas con diabetes (Jawerbaum y Capobianco 2011). En mujeres con DMT2 y diabetes gestacional, la placenta a término muestra reducidos niveles de PPAR γ (Jawerbaum y Capobianco 2011; Gomez Ribot *et al.*, 2020). Estudios de programación fetal nos permitieron evidenciar que la placenta e hígado fetal de la descendencia de rata con diabetes también presenta alteraciones en los niveles de diferentes isotipos de los PPAR (Capobianco *et al.*, 2016; Fornes *et al.*, 2018), postulándose en este estudio la posible desregulación de los niveles de los PPAR en el útero de la descendencia.

La vía de mTOR

La vía de señalización de mTOR es fundamental para regular el metabolismo, el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular. Esta vía se activa en diversos procesos fisiológicos, como la angiogénesis, la adipogénesis y la activación de los linfocitos T. La actividad de mTOR está desregulada en varias patologías, incluyendo el cáncer, enfermedades autoinmunes, diabetes mellitus y esclerosis múltiple, entre otras (Laplane y Sabatini 2009; Giacoppo *et al.*, 2017).

La proteína mTOR es una serina-treonina quinasa de 289 kDa, perteneciente a la familia de quinasas relacionadas con la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K). Esta proteína, altamente conservada evolutivamente, se organiza en dos complejos en asociación con diversas proteínas: el complejo mTOR 1 (mTORC1) y el complejo mTOR 2 (mTORC2), cada uno con funciones biológicas específicas (Laplane y Sabatini 2009) **(Esquema 5)**.



Esquema 5: Vía de señalización de mTORC1 y mTORC2 simplificada mostrando la fosforilación de S6K1, 4E-BP1, rpS6 y SKAR por mTORC1 regulando la síntesis de proteínas y la fosforilación de SGK-1 y paxilina y PKC α , involucradas en la organización citoesquelética, por mTORC2. PTEN y FoxO1 a través de TSC1/2 regulan negativamente la vía de mTORC1. La fosforilación de TSC1/2 por AMPK estimula su actividad y las fosforilaciones de TSC1/2 por AKT, ERK1/2 y RSK1 inhiben su actividad. Modificado de Laplante & Sabatini, 2009.

mTORC1

El complejo mTORC1 se compone de cinco elementos principales: mTOR (subunidad catalítica del complejo), Raptor (proteína reguladora asociada a mTOR), mLST8 (también conocida como G β L, del inglés *mammalian lethal with Sec13 protein 8*), PRAS40 (un sustrato rico en prolina de 40 kDa activado por AKT) y Deptor (una proteína con dominio DEP que interactúa con mTOR) (Laplante y Sabatini 2009). Aunque aún se desconocen las funciones precisas de muchas de las proteínas que interactúan con mTOR, se sugiere que Raptor podría modular la actividad de mTORC1 regulando su ensamblaje y reclutando sustratos para mTOR (Yonezawa *et al.*, 2004). PRAS40 y Deptor actúan como reguladores negativos de mTORC1, y al incorporarse al complejo,

contribuyen a su inhibición. Cuando mTORC1 se activa, fosforila directamente a PRAS40 y Deptor, reduciendo su interacción con estos reguladores y potenciando así su propia señalización (Wang *et al.*, 2007b).

Desde el punto de vista biológico, mTORC1 estimula el crecimiento y la proliferación celular promoviendo procesos anabólicos, como la biosíntesis de proteínas, lípidos y orgánulos, al tiempo que limita procesos catabólicos como la autofagia (Laplante y Sabatini 2009). La mayoría de los estudios sobre la función de mTORC1 se basan en el uso de rapamicina. Al ingresar en la célula, la rapamicina se une a la proteína FKBP12 y se asocia con el dominio de unión a rapamicina de FKBP12 (FRB) en mTOR, formando un complejo ternario que inhibe la actividad de mTORC1 (Guertin y Sabatini 2007).

A diferencia de su efecto sobre mTORC1, el complejo FKBP12-rapamicina no puede interactuar físicamente ni inhibir a mTORC2 en tratamientos agudos (Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2006). Esto ha llevado a caracterizar a mTORC1 y mTORC2 como el complejo sensible a la rapamicina y el complejo insensible a la rapamicina, respectivamente. Sin embargo, esta diferenciación se ha reconsiderado, ya que el tratamiento crónico con rapamicina puede inhibir mTORC2 al bloquear su ensamblaje (Sarbassov *et al.*, 2006).

mTORC1 estimula la síntesis de proteínas esenciales para el crecimiento celular al regular distintos efectores dentro de su vía de señalización. Su activación favorece la traducción de proteínas mediante la fosforilación de 4E-BP1, una proteína que normalmente se une al factor de iniciación de la traducción eucariota 4E (eIF4E). La fosforilación de 4E-BP1 impide esta unión, permitiendo que eIF4E inicie la traducción de proteínas. Además, mTORC1 fosforila la quinasa ribosomal S6K1 y activa SGK1, lo que impulsa la biogénesis del ARNm y la traducción de proteínas ribosomales a través de reguladores como SKAR, PDCD4, eEF2K y la proteína ribosómica S6 (rpS6) (Laplante y Sabatini 2009).

mTOR también juega un papel clave en la regulación de la autofagia, un proceso catabólico donde componentes intracelulares son encapsulados en autofagosomas y

degradados en los lisosomas. La autofagia es esencial para la degradación de orgánulos y el reciclaje de proteínas, proporcionando materiales biológicos necesarios para procesos anabólicos como la síntesis de proteínas y la producción de energía cuando los nutrientes son limitados. En este contexto, el lisosoma es un punto crucial de regulación en la señalización de mTORC1 (Condon y Sabatini 2019). Diversos estudios han mostrado que la inhibición de mTORC1 aumenta la autofagia, mientras que su activación reduce este proceso (Codogno y Meijer 2005).

La señalización de mTORC1 está regulada principalmente por factores de crecimiento y aminoácidos. Los factores de crecimiento activan la vía de mTORC1 mediante las rutas canónicas de señalización de insulina y Ras. Esta activación incrementa la fosforilación de TSC2 (Complejo de Esclerosis Tuberosa 2 o tuberina) mediante tres quinasas clave: PKB (también conocida como AKT), ERK1/2 y RSK1. La fosforilación de TSC2 por AKT, ERK1/2 y RSK1 inactiva el complejo TSC1/2 (Complejo de Esclerosis Tuberosa 1 y 2 o complejo hemartina-tuberina), un regulador negativo de mTORC1, cuya inhibición permite la activación de mTORC1 bajo la influencia de insulina y factores de crecimiento (Laplane y Sabatini 2009).

Además, la activación de AKT por factores de crecimiento puede activar mTORC1 de manera independiente de TSC1/2, promoviendo la fosforilación de PRAS40 y su disociación de mTORC1 (Wang *et al.*, 2007a). La unión de insulina a su receptor en la membrana celular estimula la actividad tirosina quinasa del receptor de insulina, el reclutamiento de IRS1, la generación de fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato mediante la activación de PI3K, y el reclutamiento y activación de AKT en la membrana plasmática. En numerosos tipos celulares, la activación de mTORC1 inhibe significativamente la vía PI3K-AKT en niveles previos a PI3K. Además, la activación de S6K1 por mTORC1 induce la fosforilación y reduce la estabilidad de IRS1 (Harrington *et al.*, 2005).

Además, otras condiciones y señales celulares, como estrés genotóxico y la inflamación, regulan la vía de señalización de mTORC1. En efecto, p53 controla negativamente la señalización de mTORC1 aumentando la transcripción del homólogo a tensina y fosfatasa (PTEN) y TSC2, dos reguladores negativos de la vía (Feng *et al.*, 2005). Se conoce también que FoxO1 (del inglés, *Forkhead Box O1*), factor de transcripción que

controla la expresión de genes implicados en la resistencia al estrés, el metabolismo, la detención del ciclo celular y la apoptosis (Monsalve y Olmos 2011), es un regulador negativo de la actividad de mTORC1 (Calnan y Brunet 2008). Se han identificado dos mecanismos por los cuales FoxO1 inhibe la actividad de mTORC1. El primer mecanismo depende de TSC2 y está mediado por la activación de la sestrina 3, quien activa a AMPK. El segundo mecanismo es independiente de TSC2 y está mediado, al menos en parte, a través de la activación de Rictor por FoxO1. La activación de Rictor reduce la actividad de mTORC1 dado que se favorece la asociación de Rictor con mTOR para formar mTORC2 en detrimento de la asociación Raptor-mTOR para formar mTORC1 (Chen *et al.*, 2010). Estos reguladores negativos de mTORC1, tanto PTEN como FoxO1, son blancos del miR-21, un oncomiR fuertemente asociado al crecimiento celular. La unión de miR-21 a los ARNm de PTEN y FoxO1 induce su degradación y por lo tanto regula negativamente ambos factores de transcripción (Go *et al.*, 2015).

mTORC2

El complejo mTORC2 está compuesto por seis proteínas diferentes, varias de las cuales son compartidas con mTORC1: mTOR (subunidad catalítica del complejo), Rictor (proteína reguladora asociada a mTOR), mSIN1 (proteína de interacción con quinasas activadas por estrés en mamíferos), Protor1/2 (proteína asociada a Rictor-1), mLST8 y Deptor (Laplante y Sabatini 2009). Se ha encontrado evidencia que sugiere que Rictor y mSIN1 pueden estabilizarse mutuamente, proporcionando una base estructural para mTORC2 (Jacinto *et al.*, 2004). Al igual que Deptor en mTORC1, Deptor regula negativamente la actividad de mTORC2 (Peterson *et al.*, 2009). Además, mLST8 es crucial para la función de mTORC2, ya que su eliminación disminuye notablemente tanto la estabilidad como la actividad de este complejo (Guertin y Sabatini 2007). Las principales funciones de mTORC2 están asociadas a la supervivencia celular, el metabolismo y la regulación de la apoptosis, que dependen en gran medida del estado de activación de AKT (Manning y Cantley 2007).

Las vías de señalización que llevan a la activación de mTORC2 aún no están completamente caracterizadas. Sin embargo, debido a que los factores de crecimiento incrementan la actividad quinasas de mTORC2 y la fosforilación de AKT en el residuo Ser473, se consideran señales plausibles para regular esta vía (Guertin y Sabatini 2007).

Participación de mTOR en la gestación

La vía de señalización de mTOR desempeña un papel crucial en la regulación de múltiples procesos reproductivos, incluyendo la activación y mantenimiento de los folículos primordiales en los ovarios, la proliferación celular en la granulosa y la maduración ovocitaria (Correia *et al.*, 2020). Además, su función es esencial en el desarrollo embrionario temprano, asegurando la proliferación y diferenciación de las células del trofoectodermo y del macizo celular interno. En la placenta, mTOR actúa como un regulador clave en la implantación y en la formación del tejido placentario, promoviendo la proliferación y migración celular (Correia *et al.*, 2020). Se ha demostrado que mTOR regula el metabolismo, la migración celular y la expansión de las células del trofoectodermo en el conceptus de manera dependiente de aminoácidos y glucosa (Correia-Branco *et al.*, 2018; Rosario *et al.*, 2019). En este contexto, la disponibilidad de glucosa, aminoácidos, ácidos grasos y otros nutrientes como el folato incrementa la actividad de mTOR, que a su vez coordina el tráfico de nutrientes y regula la expresión de los transportadores de membrana en la placenta (Jansson *et al.*, 2012).

Estudios en ratas preñadas han revelado que dietas bajas en proteínas y la restricción calórica reducen la activación de la vía de mTOR en las microvellosidades de la membrana plasmática de la placenta, lo que afecta el transporte de nutrientes (Rosario *et al.*, 2011). Además, disfunciones placentarias como la restricción del crecimiento fetal y la preeclampsia pueden derivar en una invasión anormal del trofoectodermo. Estas alteraciones se caracterizan por insuficiencia placentaria, disminución de la actividad de mTOR y aumento de la autofagia, acompañados de modificaciones en la disponibilidad y el transporte de aminoácidos y otros nutrientes (Correia *et al.*, 2020).

Por otro lado, en patologías metabólicas, como la obesidad y la diabetes mellitus, las placentas presentan una mayor activación de la vía de mTOR (Jansson *et al.*, 2013; Capobianco *et al.*, 2016), que se relaciona con un aumento de la expresión y una función anormal de los transportadores de nutrientes (Lager *et al.*, 2014). Estos defectos tienen como consecuencia el sobrecrecimiento fetal, que es típico de modelos animales de obesidad y diabetes gestacional. Estas condiciones afectan el desarrollo fetal y se asocian con mayor morbilidad, mortalidad y adversa programación fetal (Jawerbaum y White 2017).

Estudios recientes de nuestro laboratorio muestran una reducida actividad de la vía de mTOR en la decidua de rata diabética en la gestación temprana (Roberti *et al.*, 2021), que afectaría la nutrición histotrófica del embrión y placenta en desarrollo, postulándose en este estudio una posible programación de anomalías en reguladores de la vía de mTOR en la decidua de la descendencia de ratas diabéticas.

Regulación por microRNAs

Los microRNAs son una clase de ARN no codificante que desempeñan funciones importantes en la regulación de la expresión génica. La mayoría de los microRNAs se transcriben de secuencias de ADN a microRNAs primarios (pri-microRNAs) y se procesan en microRNAs precursores (pre-microRNAs), y finalmente a microRNAs maduros. En la mayoría de los casos, los microRNAs interactúan con la región 3' UTR de los ARNm blanco para inducir la degradación del ARNm y la represión de la traducción (Treiber *et al.*, 2019). Sin embargo, también se ha informado sobre la interacción de los microRNAs con otras regiones, incluida la 5' UTR, secuencias codificantes y promotores de genes (Broughton *et al.*, 2016). La interacción de los microRNAs con sus blancos es dinámica y depende de varios factores, como la ubicación subcelular de los microRNAs, la abundancia de los microRNAs y la afinidad de las interacciones microRNA-ARNm. Los microRNAs pueden ser secretados y transportados a las células blanco a través de vesículas, como los exosomas, o mediante la unión a proteínas. Los microRNAs

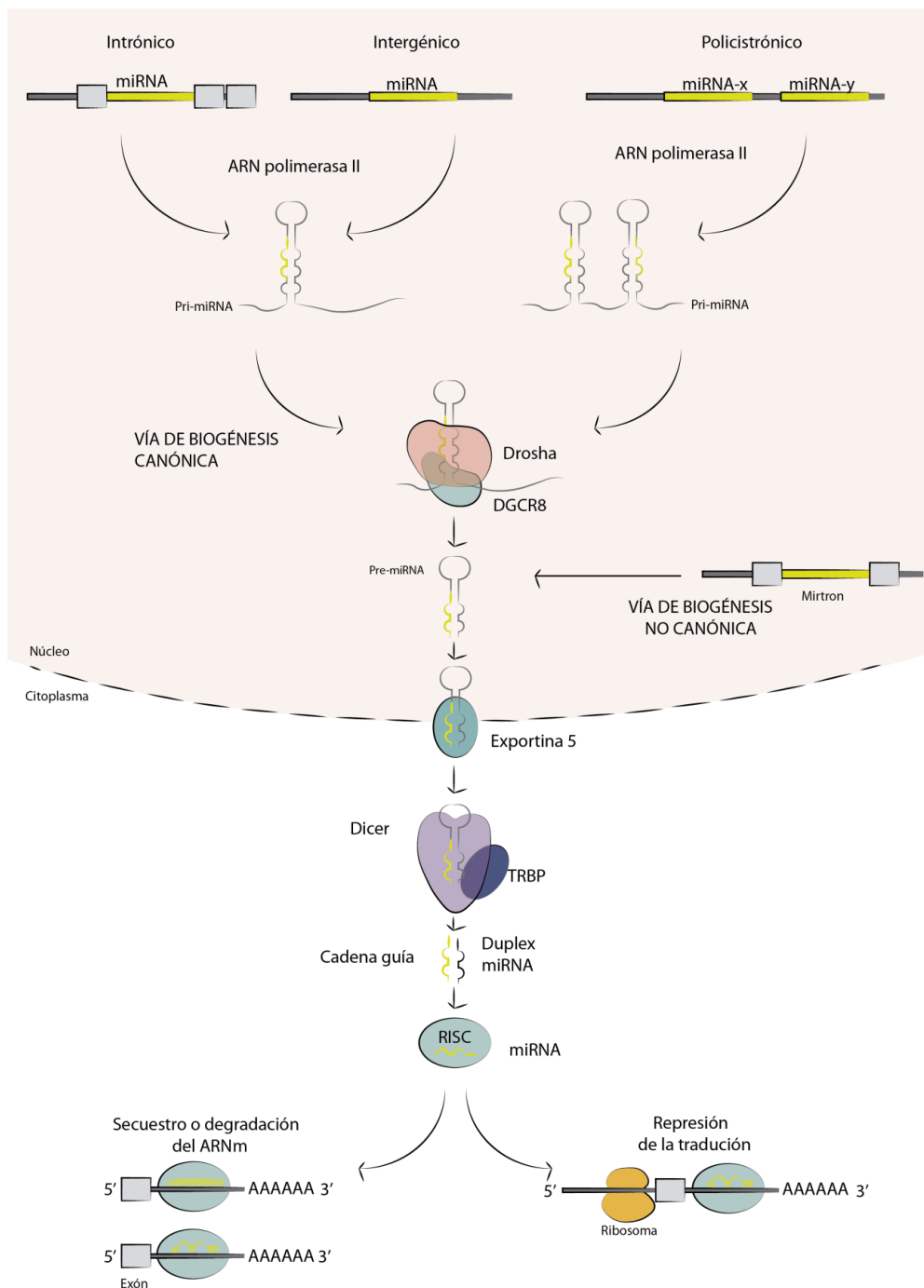
extracelulares funcionan como mensajeros químicos para mediar en la comunicación célula-célula (Treiber *et al.*, 2019).

Los microRNAs son críticos para un desarrollo normal debido a que se encuentran involucrados en una gran variedad de procesos biológicos, como el desarrollo, la diferenciación celular, la embriogénesis, el metabolismo y la apoptosis celular (Ha y Kim 2014). La expresión aberrante de los microRNAs está asociada a una gran variedad de enfermedades en el humano, incluyendo la patología diabética pregestacional y gestacional (Paul *et al.*, 2018).

Los microRNAs tienen aproximadamente 16-22 nucleótidos y su biogénesis comienza con una transcripción dependiente de la ARN polimerasa II/III (Treiber *et al.*, 2019). Aproximadamente la mitad de todos los microRNAs identificados actualmente son intragénicos, procesados principalmente a partir de intrones o exones de genes codificantes, mientras que los restantes son intergénicos, se transcriben independientemente de un gen huésped y están regulados por sus propios promotores (Komatsu *et al.*, 2023). A veces, los microRNAs se transcriben como un gran transcripto denominado “cluster”, compartiendo regiones similares llamadas “semillas” (del inglés *seed sequences*) y en cuyo caso se consideran una familia (Treiber *et al.*, 2019).

La biogénesis de los microRNAs se clasifica en dos vías: canónica y no canónica (**Esquema 6**). La vía de biogénesis canónica es la vía dominante por la cual se procesan los microRNAs. En esta vía, los pri-microRNAs se transcriben y se procesan en pre-microRNAs por la acción de un complejo microprocesador, el cual consiste en una proteína de unión al ARN llamada “DGCR8” y la RNasa III “Drosha” (Treiber *et al.*, 2019). Drosha escinde el duplex del pri-microRNA en la base de la estructura de horquilla característica del pri-microRNA. Esto conduce a la liberación de un pre-microRNA, que luego es exportado al citoplasma por la acción de la Exportina 5, donde la RNasa III, Dicer, junto con la proteína de unión TRBP eliminan el bucle de la horquilla del pre-microRNA generando un duplex de microRNA, compuesto por microRNA maduro (cadena guía) y de una cadena complementaria. La cadena guía y la complementaria se asocian luego a la proteína Argonauta y se incorporan en el complejo RISC. Dentro de este complejo se inicia una segunda etapa de maduración para separar ambas cadenas

(Huang 2017; Treiber *et al.*, 2019). La cadena complementaria continua el camino de la degradación. La cadena guía puede unirse a una secuencia específica en la región 3' UTR de su ARNm blanco para inducir la represión de la traducción (Ipsaro y Joshua-Tor 2015). También se han detectado otros sitios de unión de los microRNAs a la región 5'UTR y secuencias codificantes, así como regiones promotoras (Xu *et al.*, 2014). La unión de los microRNAs a la región 5' UTR y las regiones codificantes tienen efectos de silenciamiento en la expresión génica (Zhang *et al.*, 2018), mientras que se ha informado que la interacción de los microRNAs con la región promotora induce la transcripción (Dharap *et al.*, 2013). Sin embargo, se requieren más estudios para comprender completamente la importancia funcional de tal modo de interacción, siendo los procesos de represión de la traducción los más frecuentes (Treiber *et al.*, 2019).



Esquema 6: Biogénesis de los microRNAs.

Las vías de biogénesis de microRNAs no canónicas hacen uso de diferentes combinaciones de las proteínas involucradas en la vía canónica, principalmente Drosha, Dicer, Exportina 5 y Argonauta. En general, la biogénesis de los microRNAs no canónicos se puede agrupar en vías independientes de Drosha/DGCR8 e independientes de Dicer.

Los pre-microRNAs producidos por la ruta independiente Drosha/DGCR8 se asemejan a los sustratos de Dicer. Un ejemplo de tales pre-microRNAs son los mirtrones, que se producen a partir de los intrones del ARNm durante el *splicing* (Treiber *et al.*, 2019). Estos ARN nacientes se exportan directamente al citoplasma a través de la Exportina 1 sin la necesidad de escisión de Drosha.

Los microRNAs tienen un papel crucial como reguladores epigenéticos en la expresión y actividad de las tres isoformas de los PPAR (Zhang *et al.*, 2018). Las predicciones bioinformáticas de los microRNAs que se dirigen a las diferentes isoformas de los PPAR revelan que cientos de microRNAs diferentes podrían participar en la regulación epigenética de los PPAR en diferentes células o tejidos. Varios trabajos han demostrado la regulación de los PPAR dependiente de los microRNAs. Por ejemplo, la expresión génica de PPAR α está regulada negativamente por miR-22 y miR-21 en corazón, hígado y tejido adiposo (Kida *et al.*, 2011; Gurha *et al.*, 2013; Chuppa *et al.*, 2018). De manera similar, PPAR γ se encuentra regulado negativamente por miR-19b y miR-155 como ocurre en tejido adiposo y en otros tejidos (Tryggstad *et al.*, 2019; Juiz-Valina *et al.*, 2022). Además, en relación a PPAR δ se conoce que está regulado negativamente por miR-122 tanto en el hígado adulto como fetal (Fornes *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2023). De esta manera, se han encontrado que niveles reducidos de transcritos de los tres isotipos de PPAR está regulada por microRNAs en diferentes sistemas y tipos de células (Portius *et al.*, 2017).

Tratamientos maternos dietarios enriquecidos en ácidos grasos insaturados

Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y poliinsaturados (PUFAs) son ligandos naturales de las tres isoformas de los PPAR (Bordoni *et al.*, 2006; Jawerbaum y Capobianco 2011). Además, se ha evidenciado que los PUFA también pueden regular la vía de mTOR, sumándose a su activación por factores de crecimiento y aminoácidos (Friedrichs *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2013; Roberti *et al.*, 2021). Esto sugiere que tanto las

vías de señalización de los PPAR como las de mTOR podrían ser moduladas mediante la administración dietaria de ácidos grasos insaturados, incluyendo los MUFA, como el ácido oleico (n-9), y los PUFA, cuya deficiencia se ha asociado con la patología diabética (Jawerbaum y Gonzalez 2005; Min *et al.*, 2005).

Trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que dietas enriquecidas con aceite de cártamo, rico en ácido linoleico (PUFA n-6) y aceite de oliva, rico en ácido oleico (MUFA n-9), regulan el metabolismo lipídico placentario y fetal en ratas sanas y diabéticas (Capobianco *et al.*, 2018a; Capobianco *et al.*, 2018b). Asimismo, estudios previos han evaluado los efectos beneficiosos de dietas ricas en ácidos grasos insaturados, agonistas de los PPAR, durante la organogénesis temprana y el desarrollo feto-placentario (Higa *et al.*, 2014; Roberti *et al.*, 2021). Se ha observado que estas dietas también regulan procesos metabólicos, prooxidantes y proinflamatorios en diversos órganos fetales durante la gestación en modelos experimentales de diabetes pregestacional (Jawerbaum y Capobianco 2011; Higa *et al.*, 2014; Kurtz *et al.*, 2014b).

Al analizar la acción de los distintos MUFA y PUFA como agonistas de los PPAR, se ha evidenciado que cada uno de ellos presenta una capacidad diferencial para activar las tres isoformas de estos receptores (Hihi *et al.*, 2002). Además, es importante considerar que el transporte de los PUFA a través de la placenta es un proceso facilitado, y su incorporación y utilización varían entre los diferentes órganos fetales, lo que influye en su acción intrauterina (Higa y Jawerbaum 2013; Kurtz *et al.*, 2014a; Kurtz *et al.*, 2014b).

En forma similar, estudios realizados en mujeres con diabetes gestacional evidenciaron la capacidad de dietas enriquecidas en MUFAs de regular la trigliceridemia, mostrando las placentas a término de estas pacientes reducidos niveles de PPAR α , que fueron reestablecidos con la dieta materna enriquecida en MUFAs. Además, esta dieta mostró efectos antiinflamatorios en la placenta y en la sangre de cordón umbilical (Gomez Ribot *et al.*, 2020; Gomez Ribot *et al.*, 2023).

En relación a la programación fetal, nuestros estudios evidencian que tratamientos dietarios enriquecidos en PUFAs y MUFAs tienen efecto intergeneracional,

ya que dietas brindadas en la gestación de la F0 de ratas diabéticas, mejoran parámetros antioxidantes, antiinflamatorios y vinculados al metabolismo lipídico y funcionalidad de diferentes órganos como el corazón, el páncreas y la placenta en la descendencia (Capobianco *et al.*, 2018b; Roberti *et al.*, 2020; Taqui *et al.*, 2020). El presente estudio nos permitirá evaluar un posible efecto benéfico de dietas enriquecidas en aceite de oliva extra virgen, rico en MUFAs, en el útero de la descendencia de ratas con diabetes pregestacional.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

En la descendencia (F1) de ratas con diabetes pregestacional, en el útero decidualizado en la etapa prepuberal y en la decidua en la gestación temprana, se evidencian alteraciones en marcadores de la decidualización y un entorno prooxidante/proinflamatorio. Estas alteraciones se originan en el útero, incluso desde su desarrollo fetal debido al adverso entorno intrauterino inducido por la diabetes materna en la gestación de la F0. Anomalías en las vías de los PPAR y mTOR, y en los niveles de microRNAs que los regulan, se vinculan a dichas alteraciones.

Las alteraciones programadas por la diabetes pregestacional en el útero decidualizado de la descendencia prepúber, en la decidua de la descendencia preñada en período de postimplantación, y en el útero fetal, pueden prevenirse mediante un tratamiento dietario enriquecido en aceite de oliva extra virgen, rico en ácido oleico, agonista de los PPAR, brindado en la gestación de la F0.

Objetivos

1. Evaluar marcadores de función decidual, vías de señalización relevantes en la decidualización como son las vías de los PPAR y mTOR, analizar microRNAs que regulan dichas vías, y evaluar la presencia de un entorno prooxidante/proinflamatorio:
 - a) En el útero decidualizado de ratas prepúberes, descendientes de ratas sanas y con diabetes pregestacional.
 - b) En la decidua de ratas en el día 9 de preñez, descendientes de ratas sanas y con diabetes pregestacional.
 - c) En el útero de fetos hembra de 21 días, provenientes de ratas preñadas sanas y con diabetes pregestacional.

2. Efectuar en ratas sanas y con diabetes pregestacional, durante la preñez de la F0, un tratamiento dietario consistente en la suplementación de 6% de aceite de oliva extra virgen (enriquecido en agonistas de los PPAR), a fin de evaluar los marcadores y vías de señalización relevantes para el proceso de decidualización y el entorno prooxidante/proinflamatorio en los grupos mencionados previamente.

Objetivos específicos

1. Obtener ratas con diabetes pregestacional moderada (F0, administración de estreptozotocina neonatal), aparearlas con machos sanos en su etapa adulta y efectuar un tratamiento dietario enriquecido o no con aceite de oliva extra virgen (6%) en la gestación. En la descendencia de estos animales en la etapa prepuberal, luego de la inducción de la decidualización (PMSG-50UI /hCG-50 UI), estudiar parámetros metabólicos y evaluar en el útero decidualizado:
 - Marcadores de función decidual (niveles de prolactina, su receptor y de FABP4 y expresión de diversos marcadores).
 - Los niveles de los tres isotipos de los PPAR y de microRNAs que los regulan.
 - Marcadores del entorno prooxidante /proinflamatorio (expresión de *Cat*, *MnSod*, *Mmp9*, *Tnfa* y niveles de 4-HNE).
 - La vía de mTOR (evaluar los niveles proteicos de la forma fosforilada y total de rpS6 y 4E-BP1 y expresión de diversos reguladores negativos de dicha vía).

2. Obtener ratas con diabetes pregestacional moderada (F0, administración de estreptozotocina neonatal), aparearlas con machos sanos en su etapa adulta y efectuar un tratamiento dietario enriquecido o no con aceite de oliva extra virgen (6%) en la gestación. Aparear a la descendencia de estos animales con machos sanos y estudiar, en la gestación temprana, en el día 9 de gestación, parámetros metabólicos y los índices de implantación y reabsorción embrionaria, para luego evaluar en la decidua:
 - Marcadores de función decidual
 - La vía de los PPAR y microRNAs que los regulan
 - El entorno prooxidante y proinflamatorio.
 - La vía de señalización de mTOR.

3. Obtener ratas con diabetes pregestacional moderada (F0, administración de estreptozotocina neonatal), aparearlas con machos sanos en su etapa adulta y efectuar un tratamiento dietario enriquecido o no con aceite de oliva extra virgen (6%) en la gestación. En el día 21 de preñez de la F0, evaluar al feto hembra en desarrollo y estudiar en su útero:
 - Los niveles de prolactina y expresión de su receptor y de FABP4.
 - Los niveles de los PPAR y de microRNAs que los regulan.
 - El entorno prooxidante/proinflamatorio.

Materiales y métodos

Materiales

Salas y solventes

Salas

NaCl, Na₂CO₃, NaHCO₃, MgSO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, KCl, MgCl₂, CaCl₂, Dextrosa anhidra.

Solventes

Acetona, ácido acético glacial, cloroformo, ácido clorhídrico, etanol, éter etílico, formaldehído, glicerol, hexano, metanol, xilol, dimetilsulfóxido (DMSO).

Soluciones y medios de incubación

Buffer D: 250 mM de sucrosa en 10 mM HT

Buffer de Transferencia: Trizma base 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20%, pH 8,8.

Buffer muestra 4X: Trizma base 10 mM, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,06%, β-mercaptoetanol 5%.

Buffer citrato (SIGMA)

Buffer Tris: Tris-HCl, 100 mM (pH 7,5).

KRB (Medio Krebs-Ringer bicarbonato salino con capacidad buffer): Glucosa 5,5 mM;

Na⁺ 145 mM, Cl⁻ 127 mM, HCO₃⁻ 25 mM, Mg²⁺, SO₄²⁻ y PO₄²⁻ 1,2 mM.

PBS - Medio fosfato salino: K₂HPO₄ 1,5 g/l, KH₂PO₄ 0,2g/l, NaCl 7,75 g/l.

Solución de bloqueo: 1% de BSA en TBS.

Solución de fijación de tejido: formaldehído 4% en PBS.

Tris-CaCl₂: 0,5 M Tris, 50 mM CaCl₂, 1,5 M NaCl, 2 mM azida sódica

TBS: Trizma base 25mM, NaCl 136,7mM, KCl 2,68 mM, pH 7,4.

T-PBS: Tween-20 0,05% en PBS.

T-TBS: Tween-20 0,05% en TBS.

Drogas y reactivos

β-mercaptoetanol (PROMEGA)
3,3'-diamino-benzidina (DAB) (SIGMA-ALDRICH)
Acrilamida, N' N' bis-metil-acrilamida (BIORAD)
Agarosa (BIODYNAMICS)
Azul de bromofenol (SIGMA-ALDRICH)
Cóctel inhibidor de fosfatasas 2 (SIGMA-ALDRICH)
Cóctel inhibidor de fosfatasas 3 (SIGMA-ALDRICH)
Cóctel inhibidor de proteasas (SIGMA-ALDRICH)
dNTPs (INVITROGEN)
Dodecilsulfato de sodio (SDS) (PROMEGA)
Glicina (BIORAD)
GoTaq Polimerasa (PROMEGA)
Hexámeros Random Primers (PROMEGA)
Hematoxilina (BIOPUR)
Metabisulfito de sodio (disulfito de sodio)
M-MLV (PROMEGA)
Peróxido de hidrógeno (MALLINCKRODT)
Persulfato de amonio (PROMEGA)
Reactivo de Bradford (BIORAD).
RNA later® (AMBION).
Rojo Ponceau (SIGMA-ALDRICH)
Seroalbúmina bovina (BSA) (SIGMA-ALDRICH)
Tetra acetato de etilendiamina (EDTA) (SIGMA)
Tetrametilenetilendiamina (TEMED) (SIGMA-ALDRICH)
RNAzol (MOLECULAR RESEARCH)
Tris (hidroximetil-aminometano) (PROMEGA)
Triton X-100 (ROHM & HAAS)
Tween-20 (MERCK)

Kits comerciales de revelado

ECL Western Blotting Substrate (THERMO FISHER SCIENTIFIC).

Kit de revelado con el complejo avidina-biotina (VECTOR LABORATORIES)

Anticuerpos

Anticuerpos primarios	Tipo/especie	Laboratorio
Anti-PRL	Policlonal / Conejo	Abcam
Anti-RPRL	Policlonal / Conejo	Abcam
Anti-FABP4	Policlonal / Conejo	GeneTex
Anti-PLIN2	Policlonal / Conejo	LifeSpan BioSciences
Anti-PPARα	Policlonal / Conejo	Cayman
Anti-PPARδ	Policlonal / Conejo	Cayman
Anti-PPARγ	Policlonal / Conejo	Cayman
Anti-MMP9	Monoclonal / ratón	Calbiochem
Anti-4-HNE	Policlonal / Conejo	Abcam
Anti-P-rpS6 S235/236	Policlonal / Conejo	Cell signalling
Anti-rpS6 total	Monoclonal / Conejo	Cell signalling
Anti-4E-BP1 T37/46	Monoclonal / Conejo	Cell signalling
Anti-4E-BP1 total	Policlonal / Conejo	Cell signalling

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados para Western blot y para inmunohistoquímica.

Anticuerpos secundarios	Laboratorio
Western blot	
Anti-IgG conejo conjugado con la enzima peroxidasa	Jackson ImmunoResearch
Anti-IgG ratón conjugado con la enzima peroxidasa	Jackson ImmunoResearch
Inmunohistoquímica	
Anti-IgG de conejo biotinilado	Vector Laboratories
Anti-IgG de ratón pre-absorbido en rata biotinilado	Vector Laboratories

Tabla 2. Anticuerpos secundarios utilizados para Western blot y para inmunohistoquímica.

Primers

<i>Gen</i>	<i>Secuencia Forward del primer</i>	<i>Secuencia Reverse del primer</i>
<i>Igfbp1</i>	5'-GCCTATTGGCTGGGAAGGTT-3'	5'-TTAACAGTGCATGGGACGCA-3'
<i>Grb10</i>	5'-TCTTTGCCTTCGGCTTTTCG-3'	5'-GTTGGCTTCTTGGTTGTGGC-3'
<i>Fabp4</i>	5'-TTCGGCACGAGTTCCTTGAAA-3'	5'-ATCGAATCCACGCCAGTT-3'
<i>rPrI</i>	5'-ATTATGGTCTGGGCAGTGGC-3'	5'-AGGAAGGGCCAGGTACAGAT-3'
<i>Vegf</i>	5'-GCAGCGACAAGGCAGACTAT-3'	5'-GAGCAACCTCTCCAAACCGT-3'
<i>Ppara</i>	5'-TCACACAATGCAATCCGTTT-3'	5'-GGCCTTGACCTGTTCATGT-3'
<i>Pparg</i>	5'-CCCTGGCAAAGCATTGTAT-3'	5'-ACTGGCACCTTGAAAAATG-3'
<i>Ppard</i>	5'-CAACCCACGGTAAAGGCG-3'	5'-CCATGACTGACCCCCACTTG-3'
<i>Sirt1</i>	5'-CACAAAATCCAGCAACTCAGC-3'	5'-GCAACCTGCTCCAAGGTATC-3'
<i>Tnfa</i>	5'-GATCGGTCCCAACAAGGAGG-3'	5'-CTTGGTGGTTTGCTACGACG-3'
<i>Mmp9</i>	5'-CGGCAAACCTGCGTATTTC-3'	5'-CACCAGCGATAACCATCCGA-3'
<i>Cat</i>	5'-GACTGACCAGGGCATCAAAA-3'	5'-CTGGCGATGGCATTGAAAAG-3'
<i>Mnsod</i>	5'-CCAAAGGAGAGTTGCTGGAG-3'	5'-TGCAAGTGGGTCGTGATTAGA-3'
<i>Mtor</i>	5'-TCTGCCAACAGTTCACCCTC-3'	5'-GCTGCATGGTCTGCACAAAG-3'
<i>Pten</i>	5'-GCGTGCGGATAATGACAAGG-3'	5'-AGCCTCTGGATTGATGGCTC-3'
<i>Foxo1</i>	5'-ACGAGTGGATGGTGAAGAGTG-3'	5'-AGCTCTTCTCCGGGGTGAT-3'
<i>Pink1</i>	5'-AGCCTTGGGTTTCAGCAACA-3'	5'-GCCTCGGTGACAGCTAAGTC-3'
<i>L32</i>	5'-TGGTCCACAATGTCAAGG-3'	5'-CAAAACAGGCACACAAGC-3'
<i>microRNAs</i>		
<i>miR-21-3p</i>	5'-GGCCAACAGCAGTCGATGG-3'	
<i>miR-122-3p</i>	5'-CGCGCAACGCCATCATC-3'	
<i>miR-19b-3p</i>	5'-CGGGCCTGTGCAAATCCATGC-3'	
<i>miR-155-5p</i>	5'-GCGGGCCGTTAATGCTAATTGTG-3'	
<i>miR-22-3p</i>	5'-CCCCGAAGCTGCCAGTTG-3'	
<i>Cel-miR-39</i>	5'-UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3'	
<i>Reverse universal</i>	5'-TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3'	

Tabla 3. Primers utilizados en PCR en tiempo real y sus secuencias.

Equipos

Agitador (ARCANO)

Autoclave (ARCANO)

Baño térmico (VICKING)

Cámara de eutanasia acoplada a un tubo con CO₂

Centrífuga Legend Micro 17R (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Centrífuga Modelo 2036 (ROLEO)

Equipo para transferencia de Western Blot (BIORAD)

Estereomicroscopio (ZEISS)

Estufa a 37°C (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Estufa a 50°C (ARCANO)

GeneGenome XRQ (FISHER SCIENTIFIC)

Medidor de pH (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Microscopio Nikon (Nikon Eclipse E200) con cámara integrada (Nikon DSFi1)

NANODROP 1000 (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Real Time PCR CFX 96 (BIORAD)

Termociclador Veriti 96-wells (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

Trans-Blot Turbo Transfer (BIORAD)

Programas de análisis de imagen

Image J, Fiji, Rotor Gene Q, ImageProPlus.

Programa de análisis estadístico

Graphpad Prism 8

InsfoStat/L

Otros

Portaobjetos para inmunohistoquímica, lector y tiras reactivas OneTouch Ultra (JOHNSON & JOHNSON) para determinación de glucemias, marcadores de peso molecular full range Rainbow™ (GE HEALTHCARE), membranas de nitrocelulosa (GE

Healthcare), lápiz hidrofóbico (DAKO), pegamento fijador de cubre-objetos: bálsamo de Canadá sintético (BIOPACK), Aceite de Oliva Extra Virgen (NATURA).

Métodos

Animales

Modelo animal

Se utilizaron ratas albino Wistar adquiridas en el bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires, mantenidas en el bioterio del Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos con alimento balanceado (Asociación Cooperativa Argentina, Buenos Aires, Argentina) y agua *ad libitum*, los ciclos de luz/oscuridad fueron de 12 y 12 horas respectivamente, la temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad constante. El cuidado y uso de los animales ha seguido las normas de la guía de la Institución local, basada en las pautas del *National Institute of Health* especificadas en “*Principles of Laboratory Animal Care, NIH publication N° 85-23, revised 1985*”. Aprobación Cicual N°2373/2017, Facultad de Medicina, UBA.

Modelo experimental de Diabetes

Se utilizó un modelo experimental de diabetes pregestacional moderada mediante el método descripto originalmente en animales no preñados por Portha y col. (Portha *et al.*, 1979) y caracterizado en la gestación por nuestro grupo de trabajo (Jawerbaum y White 2010). Este consiste en la administración neonatal de estreptozotocina por inyección subcutánea (90 mg/kg) en ratas Wistar hembra de 2 días de edad.

La estreptozotocina tiene un efecto citotóxico sobre las células β -pancreáticas, generando en el adulto la muerte de una gran proporción de dichas células y por consiguiente una importante reducción de la secreción de insulina (Goyal *et al.*, 2016).

En particular, en este estudio, se administra en la etapa neonatal (2 días de edad) debido a que en esta etapa el páncreas presenta un gran número de células inmaduras con una alta capacidad de replicación en una etapa más tardía (10-14 días de edad). Por ello, la administración de la droga en esta etapa permite la regeneración parcial de la masa de dichas células β y da lugar, en el animal adulto, a un modelo que cursa con hiperglucemias moderadas (150-250 mg/dl) e intolerancia a la glucosa (Jawerbaum y White 2010).

Si bien este modelo se asemeja por su etiología a un modelo de diabetes tipo 1, al inducirse en etapas que habilitan una regeneración parcial del páncreas el modelo es moderado, con hiperglucemia leve y una reducción en los niveles de insulina séricos del 10-15% (Jawerbaum y White 2010). Al grupo experimental que corresponde a los controles, se les administró buffer citrato, debido a que es el vehículo en el que se disuelve la estreptozotocina.

El modelo de diabetes moderada se caracterizó por presentar glucemias entre 150 y 250 mg/dl en la adultez. En el caso de las hembras inyectadas con el vehículo presentaron glucemias entre 80-100 mg/dl. Las determinaciones de los niveles de glucemia se realizaron a partir de sangre obtenida de la vena central de cola con tiras reactivas comerciales y glucómetro (One Touch Ultra).

El modelo de diabetes pregestacional moderada obtenido no interfiere con la preñez y su evolución a término (Jawerbaum y White 2010).

Apareo

Ratas Wistar hembras de 3 meses de edad en estadio de proestro, sanas o con diabetes, con un peso de entre 200 y 300 g, fueron puestas en apareo con machos Wistar sanos. Durante la mañana se tomaron muestras del fluido vaginal de cada hembra y se la observó al microscopio. Se consideró día 1 de gestación al día en que se observaron espermatozoides en el extendido vaginal, día en que las hembras preñadas fueron separadas de los machos.

Tratamiento materno con aceite de oliva extra virgen

En un grupo experimental (F0) conformado por ratas sanas (Grupo control) y diabéticas (Grupo diabético), se administró desde el día 1 de gestación hasta el parto una dieta suplementada o no con un 6% de aceite de oliva conformándose los siguientes grupos de estudio:

- Grupo Control (GC) y Grupo Diabético (GD) alimentadas con alimento balanceado: **Dieta estándar.**

- Grupo Control y Grupo Diabético alimentadas con un alimento balanceado suplementado con un 6% de aceite de oliva extra virgen: **Dieta con suplemento con aceite de oliva extra virgen (AO) (Tabla 4 y Tabla 5).**

Se utilizó el aceite de oliva extra virgen de marca comercial Natura. La composición del aceite de oliva extra virgen es la siguiente:

- Ácido oleico: 69%
- Ácidos grasos poliinsaturados: 13%
- Ácidos grasos saturados: 17%

El 1% restante está compuesto por componentes no polares, como los triterpenos, esteroides y tocoferoles, y una fracción polar compuesta de polifenoles, de conocida capacidad antioxidante (Ly *et al.*, 2021).

Debe destacarse que tanto la dieta estándar como la dieta enriquecida en aceite de oliva son normolipídicas (Council 1995).

Composición dietaria	Dieta estándar	Dieta suplementada con un 6% de aceite de oliva
Carbohidratos (g/100 g)	50	48
Proteínas (g/100 g)	25	24
Grasas (g/100 g)	5	11
Calorías (Kcal %)	324	340

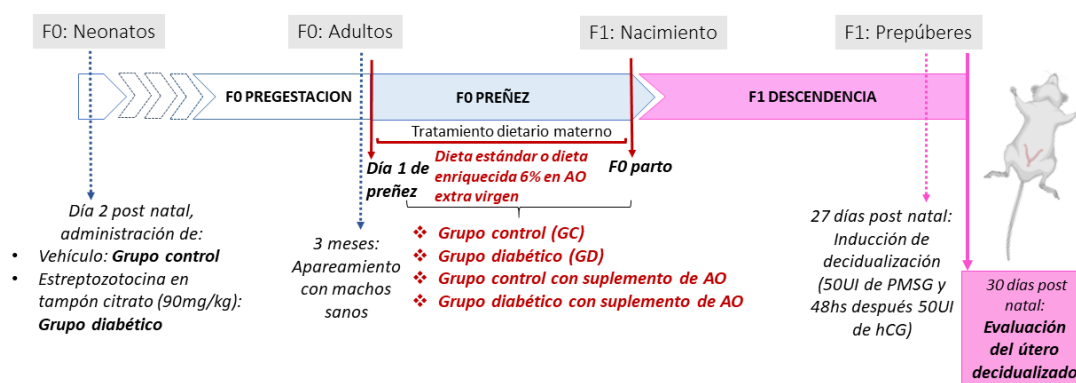
Tabla 4. Composición dietaria determinada por el Instituto Nacional de Alimentos (INAL, Buenos Aires, Argentina).

<i>Composición dietaria</i>	<i>Dieta estándar</i>	<i>Dieta suplementada con un 6% de aceite de oliva</i>
16:0 (palmítico) (g/100 g)	0,58	1,55
18:0 (esteárico) (g/100 g)	0,16	0,26
18:1 (oleico, n-9) (g/100 g)	1,27	5,77
18:2 (linoleico, n-6) (g/100 g)	1,99	2,41
18:3 (linolénico, n-3) (g/100 g)	0,73	0,57

Tabla 5. Composición de los principales ácidos grasos cada 100 gramos de alimento, determinada por el Instituto Nacional de Alimentos (INAL, Buenos Aires, Argentina).

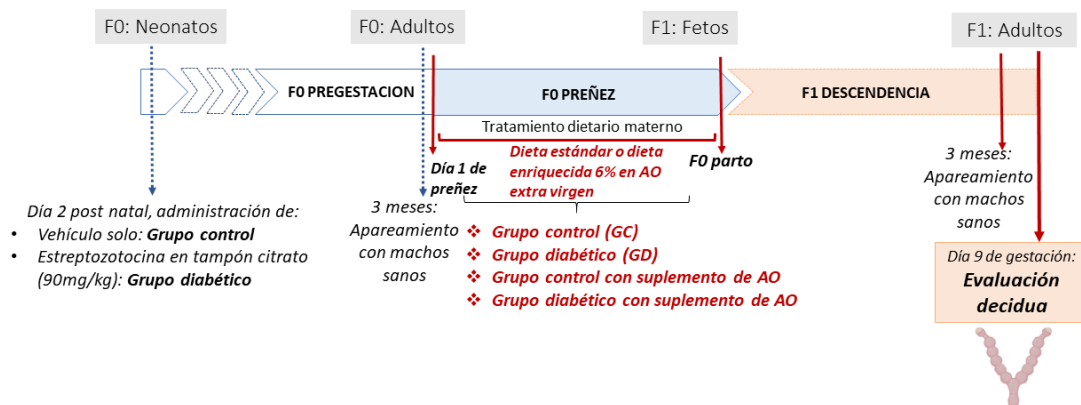
Grupos experimentales evaluados

Para llevar a cabo el **objetivo específico 1**, estudiamos a la descendencia hembra prepúber (F1) de ratas sanas y con diabetes pregestacional (F0) inducida en el período neonatal por estreptozotocina. Al día 27 post-natal se indujo la decidualización del útero de ratas prepúberes mediante la administración subcutánea de PMSG (50 UI) y 48 horas después, la administración de hCG (50 UI) (Qi *et al.*, 2018). Luego, al día 30 post-natal se practicó eutanasia en cámara de CO₂ y se extrajeron los úteros para ser evaluados (**Esquema 7**).



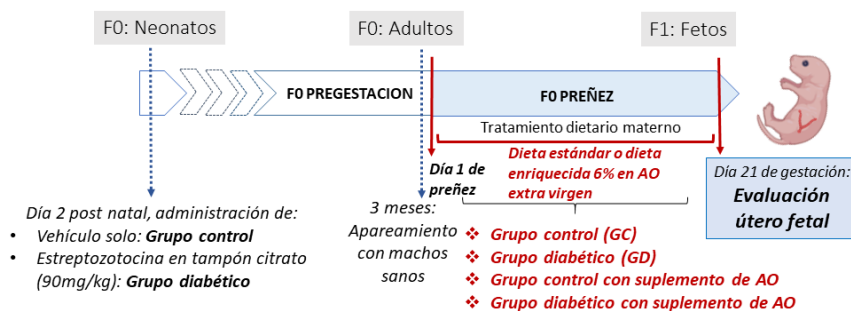
Esquema 7. Diseño experimental para obtener los cuatro grupos experimentales del objetivo 1. Grupo control (GC), Grupo diabético (GD), GC con suplemento de aceite de oliva extra virgen (AO) y GD con suplemento de AO durante la gestación (n=6-8 camadas por grupo). Los úteros decidualizados se colectaron en el día 30 post natal.

Luego, para llevar a cabo el **objetivo específico 2** estudiamos a la descendencia hembra preñada (F1) de ratas sanas y con diabetes pregestacional (F0), en gestación temprana en el período de post-implantación. Al día 9 de gestación se practicó eutanasia y se extrajeron las deciduas a ser evaluadas (**Esquema 8**).



Esquema 8. Diseño experimental para obtener los cuatro grupos experimentales del objetivo específico 2. Grupo control (GC), Grupo diabético (GD), GC con suplemento de aceite de oliva extra virgen (AO) y GD con suplemento de AO durante la gestación (n=6-8 ratas provenientes de diferentes camadas por grupo). Las deciduas de la F1 se colectaron en el día 9 de gestación.

A continuación, para llevar a cabo el **objetivo específico 3** evaluamos al útero en etapa fetal de ratas sanas y con diabetes pregestacional (F0), en el día 21 de gestación (**Esquema 9**).



Esquema 9. Diseño experimental para obtener los cuatro grupos experimentales del objetivo específico 3. Grupo control (GC), Grupo diabético (GD), GC con suplemento de aceite de oliva extra virgen (AO) y GD con suplemento de AO durante la gestación (n=6-8 ratas gestantes por grupo experimental). Los úteros fetales se colectaron en el día 21 de gestación.

Obtención de muestras

En primer lugar, para llevar a cabo el **objetivo específico 1**, las ratas prepúberes (F1) descendientes de ratas sanas y diabéticas a las cuales se les indujo la decidualización del útero, fueron anestesiadas en una cabina saturada de CO₂ y se les practicó eutanasia mediante decapitación para obtener el suero, luego se extrajo el útero y se lo colocó en cajas de Petri con solución salina. Se diseccionó el tejido uterino, un fragmento fue fijado en formaldehído 4%, y el resto del tejido se guardó a -80°C para la realización de las determinaciones que se describen a continuación.

Para llevar a cabo el **objetivo específico 2**, las ratas (F1) en el día 9 de preñez fueron anestesiadas en una cabina saturada de CO₂ y se les practicó eutanasia mediante decapitación para obtener el suero materno, luego se extrajo el útero y se lo colocó en cajas de Petri con solución salina. De cada rata, dos sitios de implantación elegidos al azar fueron fijados en formaldehído 4% y en el resto de los sitios de implantación, utilizando material de cirugía, se realizó la disección del útero bajo lupa y se obtuvo la decidua. El conceptus, conteniendo al embrión y membranas extraembrionarias, fue separado bajo lupa de la decidua y se guardaron las muestras de decidua a -80 °C para la realización de las determinaciones que se describen a continuación. Se evaluaron las deciduas correspondientes a sitios de embriones viables para las determinaciones.

Para llevar a cabo el **objetivo específico 3**, las ratas gestantes F0 en el día 21 de preñez (un día previo al parto) fueron anestesiadas en una cabina saturada de CO₂ y se les practicó eutanasia mediante decapitación para obtener el suero materno. Se extrajeron y pesaron los fetos y las placentas. La sangre fetal fue obtenida mediante decapitación y colectada en *ependorfs* con citrato de sodio (3,2%) y se determinó el sexo de cada feto utilizando un estereomicroscopio. El plasma se obtuvo luego de dos centrifugaciones a 3000 rpm por 10 minutos, se armó un *pool* con el plasma de fetos macho y otro de fetos hembra obtenidos de la misma rata gestante F0, y se lo conservó a -80°C. Los úteros de los fetos fueron extraídos cuidadosamente bajo un estereomicroscopio utilizando material de disección, y se los preservó -80°C hasta el momento de las determinaciones que se detallan a continuación. Además, se conservaron 2 úteros en formol al 4% para cortes histológicos.

Determinaciones plasmáticas

El monitoreo glucémico de los animales en las ratas con diabetes pregestacional (F0) y en su descendencia hembra (F1), se realizó mediante tiras reactivas OneTouch Ultra y un medidor de glucosa OneTouch UltraMini. La sangre fue colectada de la vena caudal.

La determinación de glucosa en suero materno, fetal, y de la progenie se realizó a partir del protocolo descrito en el kit comercial de glicemia comercializado por WIENER LAB. El procedimiento consistió en tomar 10 µl de suero de las muestras maternas o de la progenie, de plasma fetal, a las cuales se le agregó 1 ml de reactivo de trabajo, conteniendo enzimas específicas, y se incubó durante 10 minutos a 37°C. Una vez transcurrida la incubación se realizó la medición espectrofotométrica a 505 nm.

En paralelo a las determinaciones plasmáticas, se llevó a cabo el mismo protocolo utilizando un estándar provisto por el kit. Los valores de glucemia se expresan en mg/dl.

Los niveles de progesterona en suero se midieron mediante el autoanalizador COBAS 6000 de Roche.

Determinación de proteínas

La determinación de proteínas de las muestras fue realizada según la técnica descrita por Bradford (Bradford 1976). Se tomó una alícuota de 10 µl de tejido homogeneizado y se realizó una dilución 1:10. Se tomaron 10 µl de la dilución y se mezclaron con 1 ml de solución diluida 1:5 de reactivo de Bradford. Luego de 5 minutos se determinó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm. La concentración proteica de la muestra se calculó mediante la comparación de la absorbancia obtenida con una curva de calibración realizada utilizando seroalbúmina bovina en diferentes concentraciones como estándar.

Determinación de niveles de proteínas mediante Western blot

Se homogeneizó un *pool* de explantos de úteros decidualizados o de deciduas (100 mg) en 500 µl de buffer D con un cóctel inhibidor de proteasas (1:100) y cóctel inhibidor de fosfatasas (1:1000). El homogenato obtenido se dividió en alícuotas de 50 µL y se conservó a -80°C. En cada una de las muestras se determinó la cantidad de proteína a través de la técnica de Bradford. Tal como previamente se realizó en nuestro laboratorio (Capobianco *et al.*, 2016), de cada muestra se tomó una alícuota de volumen equivalente a 25 µg de proteínas y se lo diluyó en buffer muestra 4X. Antes de la siembra, las muestras fueron sometidas a 100°C durante 3 minutos con la finalidad de desnaturalizar las proteínas.

Las muestras fueron sembradas en un gel SDS-PAGE (12%) en condiciones desnaturalizantes. Finalizada la electroforesis los geles fueron lavados en buffer de transferencia, con el objeto de eliminar el SDS remanente. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm utilizando el sistema Trans-Blot Turbo Transfer *overnight* a 4°C. Finalizada la transferencia la membrana fue incubada durante 60 minutos con solución de bloqueo (1% de BSA en TBS) y posteriormente incubada con el anticuerpo primario correspondiente (*overnight* a 4°C) (**Tabla 1**, sección “Materiales”). Luego se realizaron los lavados (3 de 10 minutos con T-TBS y 3 de 10 minutos con TBS) para eliminar el anticuerpo no unido de manera específica y finalmente se incubó la membrana durante 1 hora con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 2**, sección “Materiales”).

A continuación, se realizaron nuevamente los lavados de la membrana y se procedió a detectar la señal mediante el agregado de la solución reveladora *ECL Western Blotting Substrate*. Se utilizaron estándares de peso molecular. En los casos en los que la misma membrana se utilizó para determinar a dos proteínas diferentes, la membrana fue sometida a remoción del anticuerpo primario, incubándola durante 1 hora a 50°C con una solución de 62,5 mM Tris, 100 mM β-mercaptoetanol y 2% de SDS, pH 6,2. Luego de este proceso la membrana fue incubada con solución de bloqueo toda la noche y posteriormente con el anticuerpo primario de la segunda proteína a detectar o el control de carga. La intensidad de las bandas fue analizada empleando el programa *Image J*,

teniendo en cuenta tanto la superficie como a la intensidad de las mismas, expresándose en unidades densitométricas arbitrarias relativas al control, luego de normalizarlo según el valor densitométrico correspondiente al rojo *ponceau*. Los datos que se muestran son relativos al valor 1 asignado al valor medio del grupo control.

Localización de proteínas mediante la técnica de inmunohistoquímica

Los úteros fetales, los explantos de útero decidualizado y las deciduas fueron fijados en formaldehído (4% en PBS) durante 48 horas y luego conservados en alcohol 70%. Tal como previamente se realizó en nuestro laboratorio (Higa *et al.*, 2011), los explantos fueron deshidratados utilizando alcoholes de graduación ascendente: etanol 70%, etanol 80%, etanol 90% y etanol 100%. Previamente a la inclusión en parafina, se realizó la aclaración del tejido, utilizando xilol como solvente intermediario.

Posteriormente se realizó la inclusión en parafina de los explantos deshidratados y se incubó por 12 horas en estufa a temperatura constante (56°C). Finalizado este período, se dispuso el tejido en cubos de parafina líquida y se los dejó solidificar a temperatura ambiente. Una vez que los cubos de parafina se encontraron solidificados, se realizaron cortes de 5 µm de espesor con un micrótopo y se los colocó sobre portaobjetos para inmunohistoquímica. Los cortes obtenidos a partir del procesamiento histológico fueron utilizados para realizar los ensayos de inmunohistoquímica, utilizándose para cada caso los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes (**Tabla 1 y 2**, sección “*Materiales*”). Los cortes fueron desparafinados en xilol (2 veces durante 10 minutos). A continuación, se realizó la hidratación con lavados sucesivos en etanol de concentraciones decrecientes: 100 %, 90%, 80% y 70% y un último lavado en agua destilada. Una vez finalizada la hidratación, se inhibió la peroxidasa endógena con una solución 0,5% de peróxido de hidrógeno en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente, ya que el sistema de revelado se fundamenta en interacciones con peroxidases exógenas. Posteriormente los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente diluidos en PBS-Tween (0,05%)-BSA (1%) en cámara húmeda *overnight* a temperatura ambiente.

Luego de ese período se lavó con PBS el anticuerpo primario excedente y se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios fueron utilizados en una dilución 1:200 en suero normal diluido 1:66 en PBS-tween. Luego de los lavados se agregó el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC) en una dilución de 1:100 en PBS, y se incubó durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. A continuación, se lavó y reveló la presencia del antígeno mediante el agregado del sustrato de la peroxidasa (peróxido de hidrógeno 0,01%) y DAB (0,04% en Tris 0,06 M pH 7,4). La enzima peroxidasa cataliza la oxidación del DAB produciéndose una coloración marrón en el área de la inmunomarcación. La reacción para el revelado fue detenida luego de 10 minutos con agua. El control negativo se realizó procesando los cortes en ausencia del anticuerpo primario.

Finalmente se deshidrataron los cortes sometiéndolos a: etanol 70 %, etanol 80%, etanol 90%, etanol 100% (10 minutos en cada uno), y 3 veces en xilol 100% (10 minutos). Se colocó el medio de montaje Bálsamo de Canadá Sintético sobre cada corte y se cubrió con un cubreobjetos.

Para el análisis de las imágenes, la densidad óptica de la marca fue medida en un microscopio óptico Nikon, equipado con una cámara de captura directa de imagen conectada al programa *Canon Remote Capture* y analizada con el programa FIJI. La densidad óptica fue evaluada tomando una misma área para todas las muestras, la cual se repitió 3 veces por campo, tomando 5 campos por corte, y se hicieron 3 cortes por muestra. Los datos de cada muestra se promediaron y se expresaron como unidades relativas de intensidad de color. Los datos que se muestran son relativos al valor 1 asignado al valor medio del grupo control.

Extracción de ARNm y microRNAs

Tal como se realizó previamente en nuestro laboratorio (Fornes *et al.*, 2020), se obtuvo el ARN mensajero y los microRNAs de un *pool* de explantos de úteros

decidualizados o fetales o de deciduas (100 mg) a partir de tejido guardado a -80°C. Estos tejidos fueron homogeneizados en reactivo RNAzol (Molecular Research Center, OH, USA) y extraído siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras atravesaron dos rondas de purificación, una para obtener el ARNm y otra para obtener los microRNAs.

El ARNm fue precipitado y resuspendido en 30 µl de agua estéril libre de ARNasas. El cDNA fue sintetizado incubando 2 µg (1 µg/µl) de ARN extraído en un primer buffer conteniendo hexameros Random Primers (Promega), a 72°C durante 5 min. Después, se agregó una mezcla de reacción conteniendo la enzima MMLV (PROMEGA), y cada uno de los cuatro dNTP (Invitrogen). Se incubó a 37°C durante 60 min, seguido de 15 minutos a 72°C.

Análisis de ARNm por PCR en tiempo real

Tal como se realizó previamente en nuestro laboratorio (Fornes *et al.*, 2020), la amplificación del cDNA por PCR en tiempo real se realizó utilizando un buffer con dNTPs, enzima GoTaq Polimerasa, el intercalante fluorescente Eva Green y el par de cebadores específicos (**Tabla 3**, sección “*materiales*”). Como control interno se utilizó el ARN mensajero de la proteína ribosomal L32 (RPL32) y del 18s (18S), promediando su CT.

La dilución de cDNA utilizada fue seleccionada mediante la realización de una curva de concentración de cDNA, que consistió en la amplificación de diluciones en serie del cDNA de interés. Se corroboró que la eficiencia de amplificación de la curva fuera de 0,8-1,2 y se seleccionó la dilución que presentó el valor de amplificación deseado, dentro del rango lineal de amplificación. La concentración de cebadores, la temperatura de apareamiento y extensión se seleccionaron de manera que no se observara amplificación de cebadores.

Las condiciones de amplificación consistieron en un paso inicial de 95°C durante 4 minutos y luego 40 ciclos de:

- Desnaturalización a 95°C durante 10 segundos

- Apareamiento, la temperatura depende de cada par de cebadores, durante 15 segundos,

- Extensión a 72°C durante 20 segundos

Los resultados se analizaron con el programa CFX Maestro y se expresaron mediante el modelo matemático 2 delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) para el cálculo de la expresión relativa del gen de interés respecto de los controles endógenos L32 y 18S, promediando sus CTs (Livak y Schmittgen 2001).

Análisis de microRNAs por PCR en tiempo real

Para determinar los niveles de microARNs se utilizó la técnica de cebador *stem loop* (Duca *et al.*, 2022). Esta técnica consiste en realizar la retrotranscripción de ARN a ADN de los microRNAs utilizando en primer lugar un cebador que en su región 3' forma un *loop*. Como control y gen de referencia (*spike-in*) se agregaron 10 fmoles del microRNA *cel-39* que fue sintetizado por IDT (Integrated DNA Technologies). Para realizar la retrotranscripción se incubó en un buffer con los cebadores correspondientes (**Tabla 3**, sección "*materiales*"), MMLV (ambos de PROMEGA) y dNTPs (Invitrogen). Se incubó a 37°C durante 60 min, seguido de 15 minutos a 72°C.

La PCR en tiempo real se preparó a partir de una mix que contenía *buffer*, enzima GoTaq Polimerase, dNTP mix, el intercalante Eva Green, un cebador *reverse* universal utilizado y un cebador *forward* específico para cada microRNA. La PCR en tiempo real se realizó en un equipo CFX-96 Real Time System C1000 Touch Thermal Cycler y consistió en 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C y luego 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 15 segundos a la temperatura adecuada para cada cebador (62-64°C) y un minuto a 60°C. Luego de los 40 ciclos se realizó una curva de *melting*. Los resultados se analizaron con el programa CFX Maestro y se expresaron mediante el modelo matemático 2 delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) para el cálculo de la expresión relativa del gen de interés respecto del control de referencia *cel-39* (Livak y Schmittgen 2001).

Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media $\pm$ error estándar. Se comprobó la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro-Wilk y la homocedasticidad mediante la prueba de Levene (software InfoStat/L). Los grupos se analizaron, mediante ANOVA de dos factores y post test de Bonferroni (software Graphpad Prism 8).

En el caso de número de implantes y reabsorciones los datos se presentan como porcentaje (número de reabsorciones/sitios de implantación totales) y fueron comparados mediante la prueba de Chi-cuadrado.

En todos los casos, las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el p valor fuera menor a 0,05 ($p < 0,05$).

Resultados

Capítulo 1:

Efecto de la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen en el útero decidualizado de crías prepúberes de ratas diabéticas.

La diabetes materna conduce a un entorno proinflamatorio intrauterino, vinculado a la adversa programación fetal que afecta al desarrollo feto-placentario e incrementa el riesgo de patologías perinatales y neonatales (Lappas *et al.*, 2011; Monteiro *et al.*, 2016; Barbour 2019). En estudios previos de nuestro grupo de laboratorio realizados en modelos experimentales de diabetes y preñez, se evidenciaron alteraciones como elevados niveles de marcadores prooxidantes y proinflamatorios en la placenta y en diferentes órganos fetales, asociados a anomalías en los niveles de los receptores PPAR, reguladores del entorno prooxidante y proinflamatorio (Jawerbaum y Capobianco 2011; Capobianco *et al.*, 2016; Fornes *et al.*, 2020). En forma interesante, tratamientos enriquecidos en aceite de oliva extra virgen, rico en ácidos grasos monoinsaturados que activan a los PPAR y que ejercen acciones antioxidantes, evitan el daño placentario y en diferentes órganos fetales en modelos experimentales de diabetes pregestacional y gestacional (Capobianco *et al.*, 2018b; Fornes *et al.*, 2020; Roberti *et al.*, 2020). Constituyendo la base de este trabajo de tesis, se destaca que poco se conoce de la programación del daño en el útero y en particular en la decidua, en la descendencia de madres con diabetes. La activación de los PPAR es capaz de regular múltiples genes altamente vinculados a la función decidua (Roberti *et al.*, 2020; Yu *et al.*, 2020), siendo la decidua importante en la implantación, y en el desarrollo embrionario, placentario y fetal (Ng *et al.*, 2020).

En la primera etapa del presente trabajo, el objetivo fue caracterizar el modelo experimental en cuanto a parámetros metabólicos y morfométricos, para luego evaluar marcadores de decidualización, los niveles de los PPAR, su regulación y su vinculación a la vía de mTOR en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas sanas y diabéticas. Además, evaluamos el efecto de dietas enriquecidas en aceite de oliva extra virgen brindadas durante la gestación F0 y su capacidad de modular la decidualización en la descendencia.

1.1. Glucemias y parámetros morfométricos en las ratas prepúberes

En este trabajo se utilizó un modelo de diabetes moderada, obtenido mediante la administración de estreptozotocina, a ratas en el período neonatal (Jawerbaum y White 2010). De esta manera, se obtuvo la generación F0 de ratas diabéticas, mientras que a las ratas de la F0 control se les administró vehículo solo. El estado diabético se confirmó en los animales adultos y antes del apareamiento. Luego, se cruzaron ratas hembras adultas diabéticas y control (F0) con machos adultos control para generar la siguiente generación de ratas (F1) (**Esquema 7**, sección “*materiales y métodos*”). Un grupo de ratas control y un grupo de ratas diabéticas (F0) fueron alimentadas con dieta estándar o suplementada con aceite de oliva extra virgen al 6% (Natura, AGD, Argentina) desde el día 1 de gestación y hasta el parto. Estas dietas han sido administradas previamente en ratas diabéticas durante la gestación, evidenciándose efectos benéficos a nivel embrionario y fetal (Higa *et al.*, 2014; Fornes *et al.*, 2020). Estudios anteriores han demostrado la inducción de la diabetes mellitus gestacional en crías de tres meses de edad descendientes de ratas diabéticas apareadas con machos control, incluso si recibieron una dieta enriquecida con aceite de oliva extra virgen durante la gestación (Capobianco *et al.*, 2016). En esta primera parte del estudio, las crías hembras de ratas diabéticas, que desarrollarán diabetes mellitus gestacional se estudiaron en la etapa prepuberal (**Esquema 7**, sección “*materiales y métodos*”).

La glucemia materna (F0), parámetro diagnóstico para la diabetes, se midió en el día 1 y en el día 21 de preñez, encontrando un aumento de la misma tanto en el día 1 como en el día 21 de preñez en el grupo de ratas con diabetes (F0) respecto a los controles ($p < 0,05$ vs. GC). El aumento de la glucemia no se vio afectado por la suplementación de aceite de oliva extra virgen en ratas con diabetes (**Tabla 6**). Conociendo que este modelo de diabetes programa alteraciones en su descendencia adulta (Capobianco *et al.*, 2016), evaluamos las glucemias en su descendencia en etapa prepuberal. Las crías de ratas diabéticas mostraron normoglucemia en la etapa prepuberal (F1), independientemente de si sus madres fueron alimentadas con una dieta estándar o con una dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen durante la gestación (**Tabla 6**).

GLUCEMIA (mg/dl)	GRUPO CONTROL	GRUPO DIABÉTICO	GRUPO CONTROL CON SUPLEMENTO DE AO	GRUPO DIABÉTICO CON SUPLEMENTO DE AO
(F0) MATERNA DÍA 1	103 ± 5 ^a	175 ± 17 ^b	94 ± 4 ^a	188 ± 35 ^b
(F0) MATERNA DÍA 21	97 ± 3 ^a	145 ± 44 ^b	81 ± 3 ^a	163 ± 44 ^b
(F1) CRÍA PREPÚBER	103 ± 6 ^a	102 ± 7 ^a	105 ± 5 ^a	103 ± 4 ^a

Tabla 6. Glucemia materna (F0) en ayunas en el día 1 y 21 de preñez de ratas del grupo control (GC) y del grupo diabético (GD), que recibieron o no suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) durante la gestación, y de sus crías en etapa prepuberal (F1). Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. *Letras distintas denotan diferencias significativas.*

Para inducir la decidualización endometrial, las ratas prepúberes (F1) recibieron una inyección de 50 UI de PMSG y 48 horas después una inyección de 50 UI de hCG, y fueron evaluadas 24 horas después de la última inyección (**Esquema 7**, sección “*materiales y métodos*”). Al analizar la histología del útero luego de la inducción, no encontramos diferencias histológicas entre los cortes uterinos de crías F1 de ratas diabéticas y de ratas controles, tanto si sus madres fueron alimentadas con dieta estándar o con dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen durante la gestación F0 (**Figura 2**).

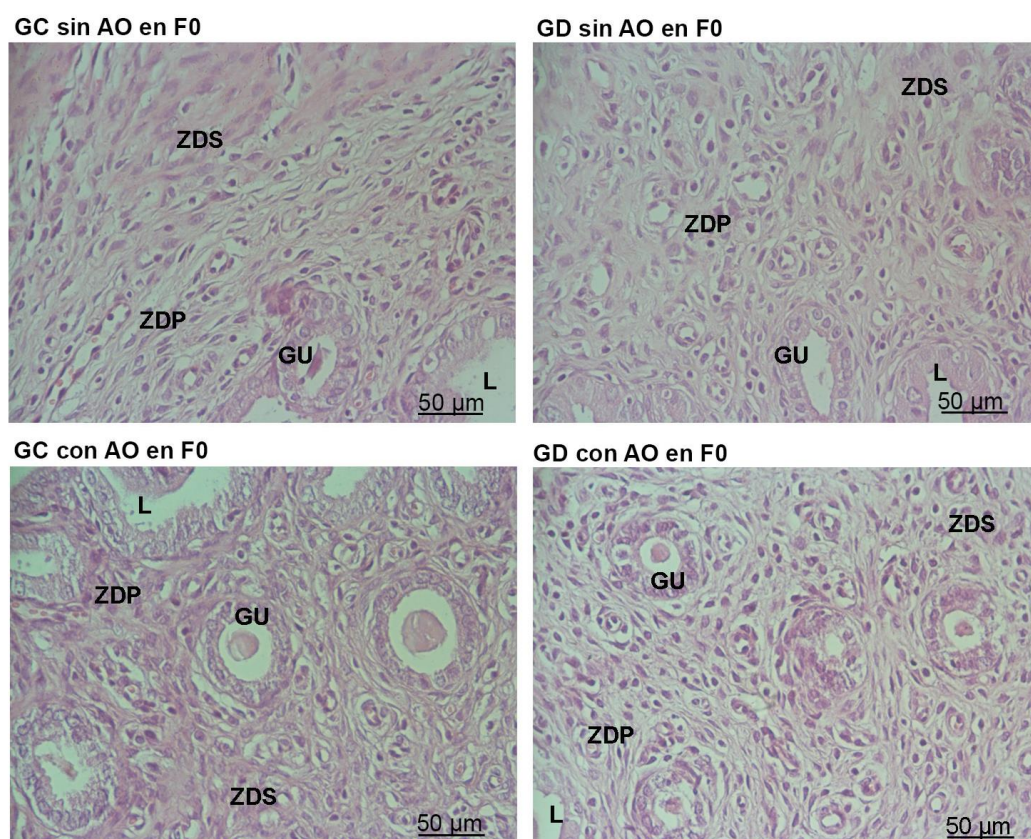


Figura 2: Cortes histológicos del útero decidualizado de ratas prepúberes decidualizadas descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. L: lumen uterino, GU: glándula uterina, ZDP: zona decidual primaria, ZDS: zona decidual secundaria. Aumento 400X (escala 50 μ m).

A continuación, evaluamos los pesos corporales y no encontramos diferencias significativas en las crías de ratas diabéticas en relación al control, tanto si sus madres fueron alimentadas con dieta estándar o con dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen durante la gestación (**Figura 3A**). De manera similar, al evaluar los pesos uterinos de las ratas decidualizadas no encontramos diferencias significativas en las crías de ratas diabéticas en relación al control, independientemente de si sus madres fueron alimentadas con una dieta estándar o con una dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen durante la gestación (**Figura 3B**). Además, evaluamos los niveles séricos de progesterona, hormona clave en el proceso de decidualización (Ema *et al.*, 2003) y no encontramos diferencias significativas en las crías de ratas diabéticas en relación al

control, tanto si sus madres fueron alimentadas con dieta estándar o con dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen durante la gestación (**Figura 3C**).

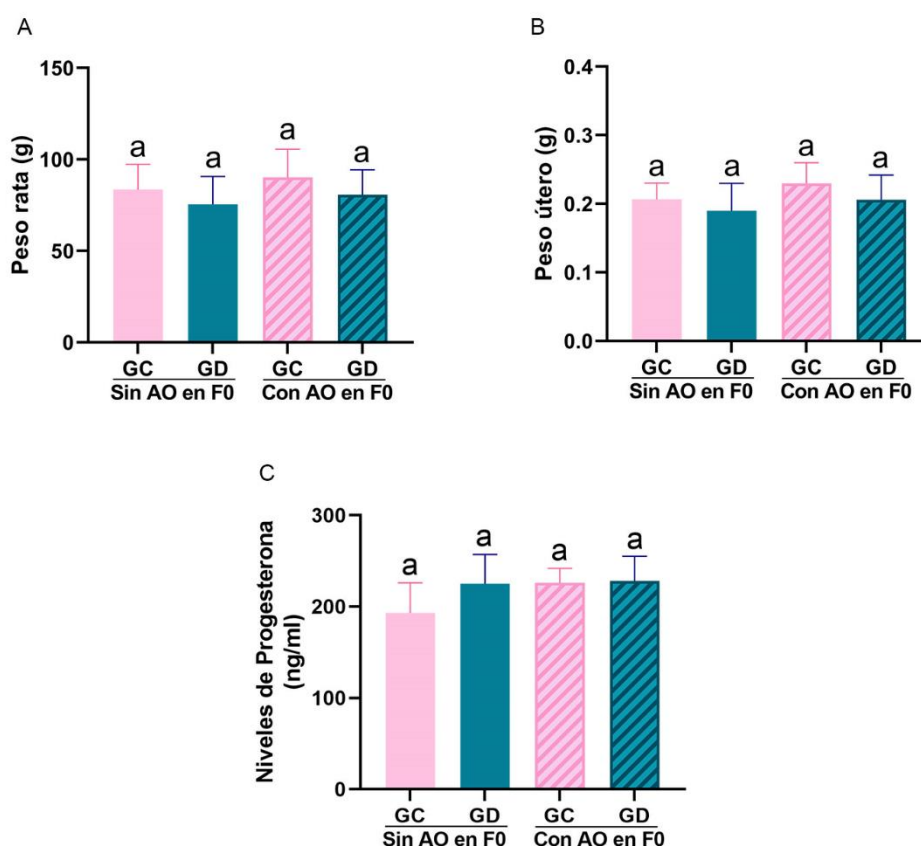


Figura 3: Peso corporal (A), peso uterino (B) y niveles de progesterona (C) de ratas prepúberes descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. *Letras distintas denotan diferencias significativas.*

1.2. Marcadores de decidualización en el útero decidualizado de ratas prepúberes

A continuación, evaluamos marcadores de decidualización en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas sanas y diabéticas. La prolactina es un importante marcador de la decidualización del útero, un proceso crítico para la implantación y el desarrollo embrionario en la gestación temprana (Jabbour y Critchley 2001; Berkhout *et al.*, 2020). Encontramos una reducción en los niveles de prolactina (PRL) en el útero decidualizado de las crías prepúberes de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC). Sin embargo, esta reducción no es significativa cuando en la

gestación F0 las madres recibieron dieta enriquecida con aceite de oliva extra virgen (**Figura 4A**). Además, evaluamos los niveles proteicos del receptor de prolactina (rPRL) y encontramos que están disminuidos en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC). Esta reducción fue prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p < 0,01$ vs. GD) (**Figura 4B**).

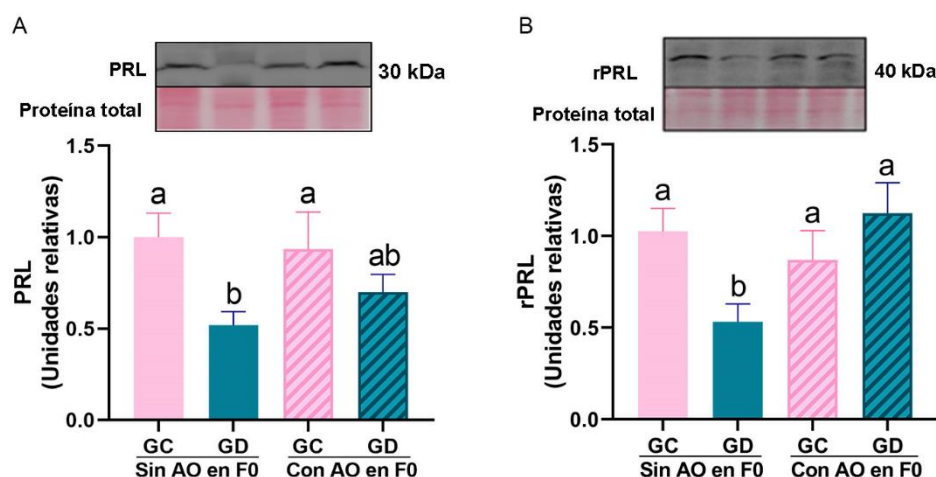


Figura 4: Niveles proteicos de PRL (A) y de rPRL (B) en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. $n = 6-8$. Letras distintas denotan diferencias significativas.

Luego, medimos los niveles de ARNm del conocido marcador de función decidual, *Igfbp1* (proteína de unión al factor de crecimiento insulínico 1) que regula la biodisponibilidad de los factores de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF1) y tipo 2 (IGF2), regulando los procesos de crecimiento y diferenciación en la decidua (Ganeff *et al.*, 2009). Encontramos un aumento en los niveles de ARNm de *Igfbp1* en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC), incremento que también se evidencia cuando la dieta materna fue suplementada con aceite de oliva extra virgen (**Figura 5A**). Además, evaluamos la expresión del factor de crecimiento *Grb10* (del inglés, *growth factor receptor-bound protein 10*), partícipe en el proceso de implantación uterina y relevante en la placentación (Charalambous *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2014). Encontramos un aumento en

los niveles de *Grb10* en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas en relación al control ($p<0,01$ vs. GC) y esta alteración fue prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p<0,05$ vs. GC) (**Figura 5B**).

FABP4 (del inglés, *fatty acid binding protein 4*) es una proteína de unión a ácidos grasos involucrada en el transporte intracelular y transcelular de lípidos, relevante a su vez por su función en el proceso de decidualización (Wang *et al.*, 2017). Al evaluar los niveles de ARNm de *Fabp4* encontramos un aumento en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas en relación al control ($p<0,05$ vs. GC). Esta alteración fue prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p<0,05$ vs. GD) (**Figura 5C**). Además, evaluamos los niveles de la proteína FABP4 y encontramos un aumento en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas en relación al control ($p<0,05$ vs. GC) y esta alteración fue prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p<0,05$ vs. GD) (**Figura 5D**).

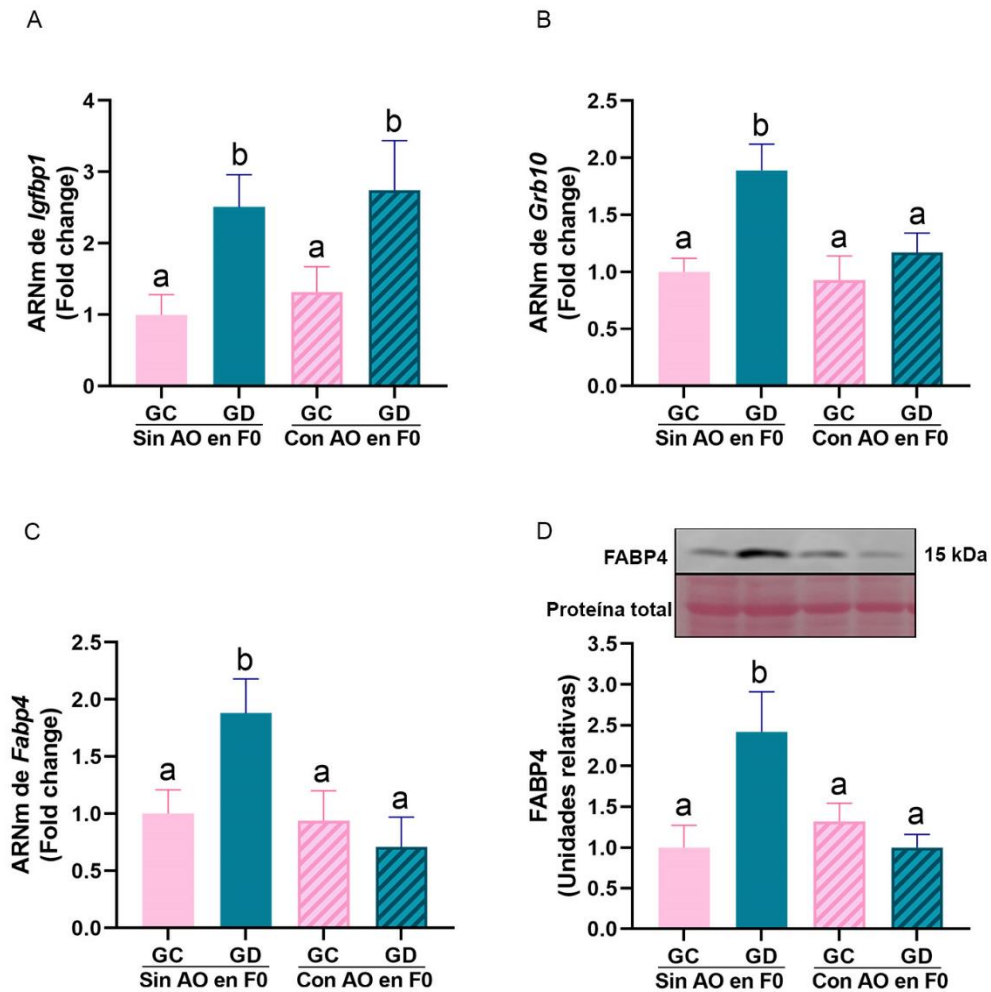


Figura 5: Niveles de ARNm de *Igfbp1*(A), *Grb10* (B) y de ARNm (C) y proteicos de FABP4 (D) en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. *Letras distintas denotan diferencias significativas.*

Asimismo, la familia de proteínas perilipina, como perilipina 2 (PLIN2), son importantes reguladores del metabolismo lipídico, controlan el almacenamiento, movilización y utilización de lípidos, relevantes en el proceso de decidualización (Roberti *et al.*, 2018). Evaluamos los niveles de PLIN2 en cortes histológicos de los úteros decidualizados y no encontramos diferencias significativas entre las crías de ratas diabéticas con o sin suplemento de aceite de oliva extra virgen en la gestación F0 (**Figura 6A y B**).

Por otro lado, como mediador clásico en procesos angiogénicos en la decidualización evaluamos los niveles de ARNm de *Vegf* (factor de crecimiento endotelial vascular) (Guo *et al.*, 2021), sin encontrar cambios en el útero decidualizado de crías de ratas diabéticas que recibieron o no suplemento de aceite de oliva extra virgen en la F0 (**Figura 6C**).

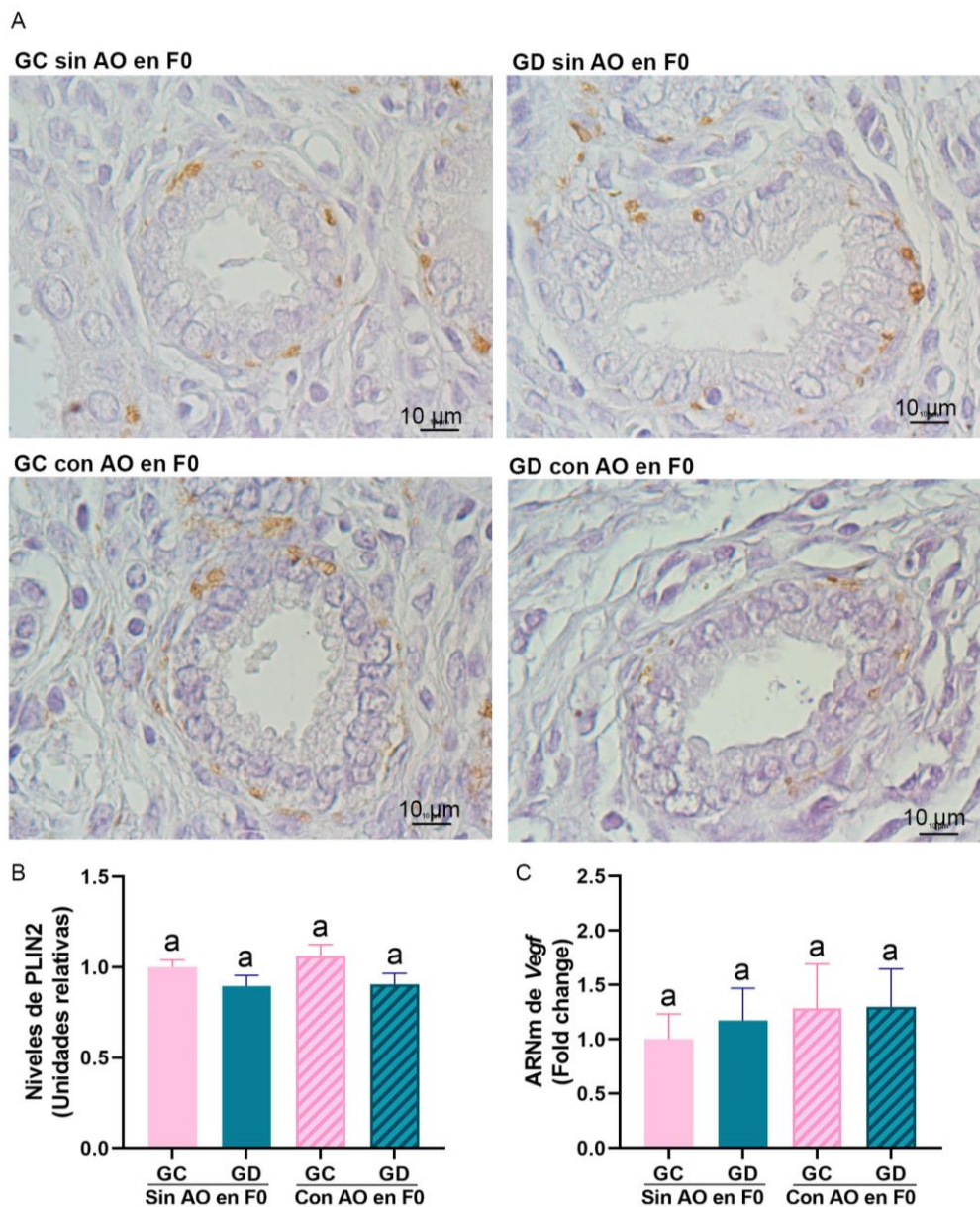


Figura 6: Inmunomarcación de PLIN2 (A) y sus niveles (B) en glándulas del útero decidualizado y niveles de ARNm de *Vegf* (C) en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. Letras distintas denotan diferencias significativas. Aumento 1000X (escala 10 µm).

1.3. Niveles de los PPAR y de los microRNAs que los regulan en el útero decidualizado de ratas prepúberes

Los PPAR son receptores nucleares que se activan por ligandos de naturaleza lipídica, entre ellos diversos MUFAs y PUFAs. Una vez activados, actúan regulando la expresión de genes involucrados en el metabolismo lipídico, en vías antioxidantes y procesos del desarrollo (Jawerbaum y Capobianco 2011; Lendvai *et al.*, 2016; Mirza *et al.*, 2019). Los PPAR son cruciales para la decidualización, al regular la diferenciación celular y el metabolismo energético, así como también en el desarrollo embrionario y feto-placentario (Jawerbaum y Capobianco 2011; Roberti *et al.*, 2023). La desregulación de los PPAR se asocia con cambios metabólicos e inflamatorios en la diabetes materna (Mirza *et al.*, 2019; Gomez Ribot *et al.*, 2020).

Primero, estudiamos los niveles de ARNm de *Ppara* en el útero decidualizado de las crías prepúberes de ratas diabéticas. Observamos un aumento en los niveles de ARNm de *Ppara* en los úteros decidualizados de crías prepúberes de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC) y esta alteración fue prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p < 0,05$ vs. GD) (**Figura 7A**). Sin embargo, cuando evaluamos los niveles proteicos de PPAR α no encontramos diferencias significativas entre las crías de ratas diabéticas con o sin suplemento de aceite de oliva extra virgen en la F0 (**Figura 7B**).

La expresión de los PPAR es regulada por ciertos microRNAs en varios tejidos (Portius *et al.*, 2017). PPAR α está regulado negativamente por miR-22 y miR-21 en el corazón y en el hígado (Kida *et al.*, 2011; Gurha *et al.*, 2013; Chuppa *et al.*, 2018), y ambos microRNAs están involucrados en el proceso de decidualización (Ma *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2019). En este trabajo, evaluamos en los úteros decidualizados de crías de ratas diabéticas los niveles de miR-22 y no encontramos diferencias significativas entre las crías de ratas diabéticas que recibieron o no suplemento de aceite de oliva extra virgen en la gestación F0 (**Figura 7C**). Sin embargo, al evaluar los niveles de miR-21 observamos una reducción en los úteros decidualizados de crías prepúberes de ratas diabéticas en comparación al control ($p < 0,01$ vs. GC). Además, esta reducción fue

prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p < 0,05$ vs. GD) (**Figura 7D**).

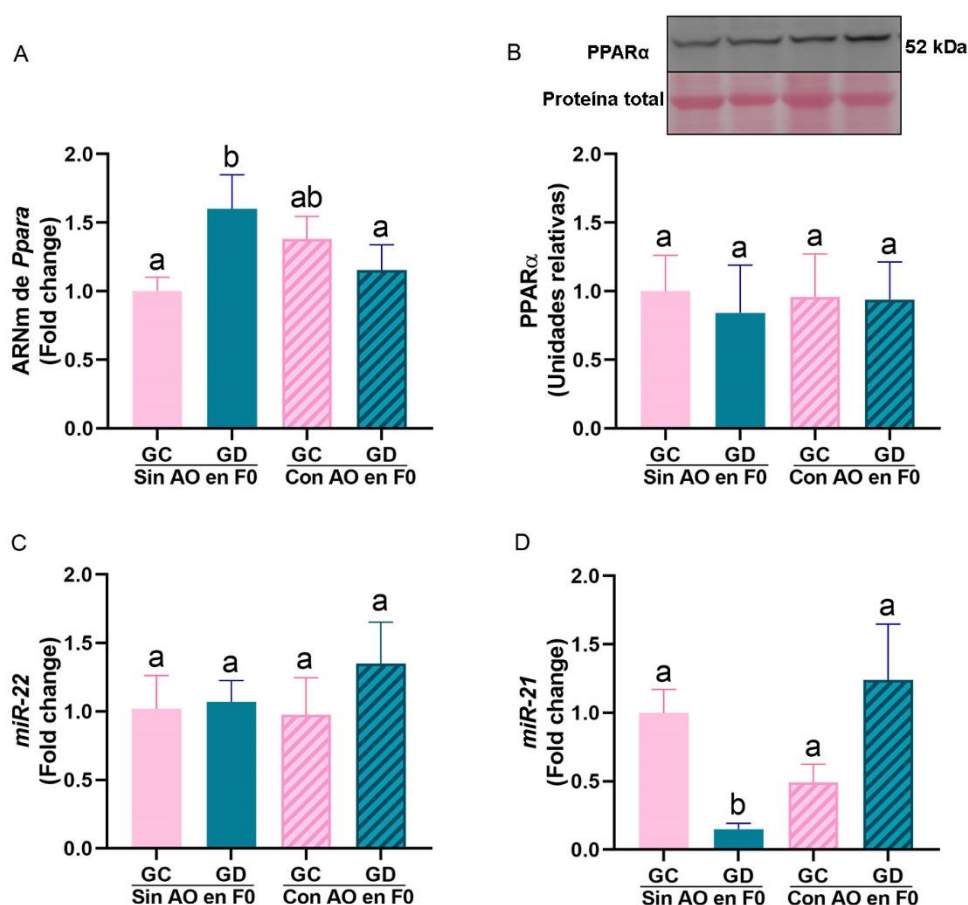


Figura 7: Niveles de ARNm (A) y proteicos (B) de PPAR α , y del miR-22 (C) y miR-21 (D) en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. $n = 6-8$. Letras distintas denotan diferencias significativas.

Por otro lado, observamos un aumento significativo en los niveles de ARNm de *Pparg* en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC) y esos niveles no se vieron modificados ante la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen (**Figura 8A**). En forma similar, encontramos niveles elevados de la proteína PPAR γ en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC), alteración

que persiste ante la suplementación de la dieta materna con aceite de oliva extra virgen ($p < 0,01$ vs. GD) (**Figura 8B**).

A continuación, evaluamos los niveles del miR-19b y miR-155 que regulan negativamente la expresión de PPAR γ , como se conoce en tejido adiposo (Tryggstad *et al.*, 2019; Juiz-Valina *et al.*, 2022). Al analizar los niveles de miR-19b observamos una reducción en los úteros decidualizados de crías prepúberes de ratas diabéticas en comparación al control ($p < 0,01$ vs. GC) y estos niveles no fueron modificados por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen (**Figura 8C**). De manera similar, al evaluar los niveles del miR-155 encontramos una reducción en los úteros decidualizados de crías prepúberes de ratas diabéticas en comparación al control ($p < 0,01$ vs. GC) y la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen no modificó esta alteración (**Figura 8D**).

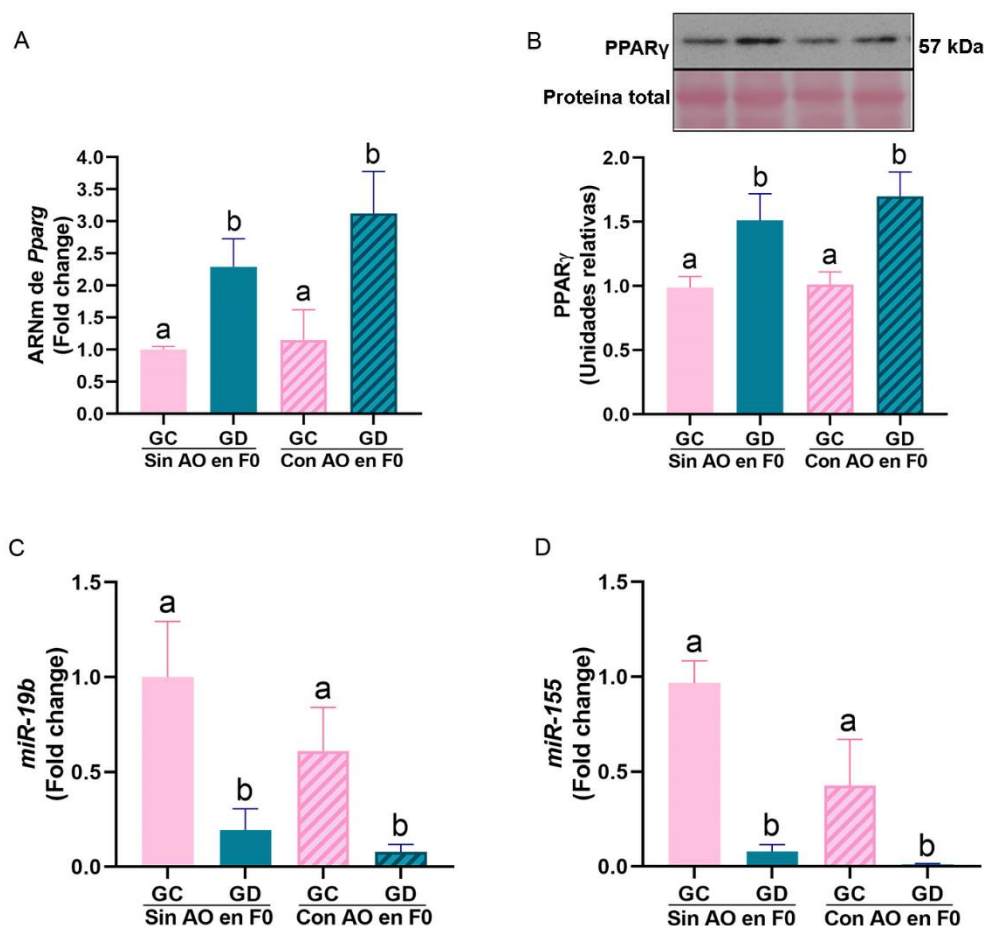


Figura 8: Niveles de ARNm (A) y proteicos (B) de PPAR γ , y del miR-19b (C) y miR-155 (D) en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación

F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. *Letras distintas denotan diferencias significativas.*

A continuación, al evaluar los niveles de ARNm y de proteína PPAR δ no encontramos diferencias significativas en los úteros decidualizados entre las crías de ratas diabéticas que recibieron o no el suplemento materno de aceite de oliva extra virgen en la gestación F0 (**Figura 9A y B**). Se sabe que PPAR δ está regulado negativamente por miR-122 tanto en el hígado adulto como fetal (Fornes *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2023). Si bien los niveles de PPAR δ se mantuvieron sin cambios entre los distintos grupos estudiados, decidimos evaluar los niveles del miR-122 en los úteros decidualizados. Encontramos niveles reducidos de miR-122 en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas en relación al control ($p<0,05$ vs. GC) y esta alteración se previno con la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p<0,05$ vs. GD) (**Figura 9C**). Se conoce que en diversos tejidos, un gen blanco de miR-122 es *Sirt1*, gen que codifica a la Sirtuína 1, proteína involucrada en la regulación de múltiples procesos metabólicos (Boutant y Canto 2014). Al evaluar los niveles de *Sirt1* encontramos un aumento en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas en comparación al control ($p<0,05$ vs. GC) y esta alteración fue prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p<0,01$ vs. GD) (**Figura 9D**).

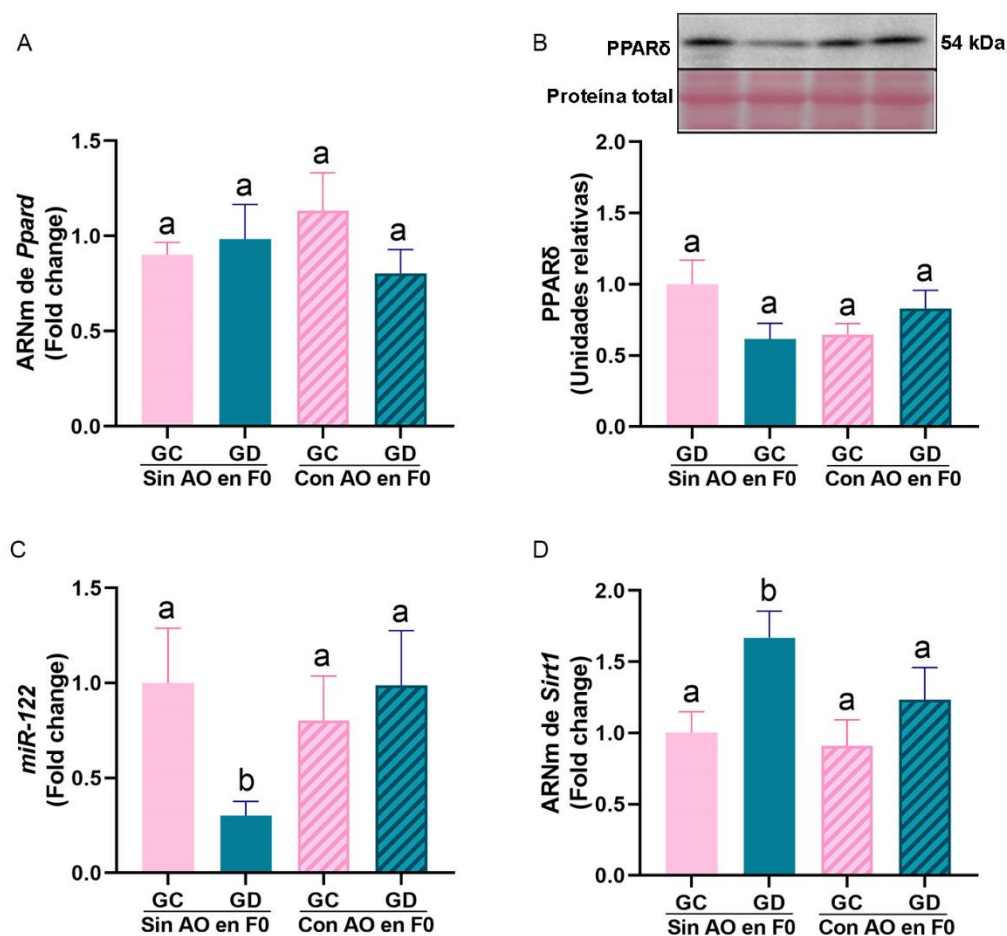


Figura 9: Niveles de ARNm (A) y proteicos (B) de PPAR δ , del miR-122 (C) y de ARNm de *Sirt1* (D) en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento de aceite de oliva extra virgen (AO) en la F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. Letras distintas denotan diferencias significativas.

1.4. Vías proinflamatorias y prooxidantes en el útero decidualizado de ratas prepúberes

En la fisiopatología de la diabetes materna y la programación fetal cobra relevancia la presencia de un entorno prooxidante y proinflamatorio (Jawerbaum y Gonzalez 2006; Lappas *et al.*, 2011), por lo que nos resultó de interés evaluar los niveles de ARNm de *Tnfa*, *Cat* y *Mnsod*. Con respecto a *Tnfa*, encontramos un aumento en sus niveles de ARNm en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas en comparación con el control ($p < 0,05$ vs. GC), el cual fue prevenido por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p < 0,05$ vs. GD) (**Figura 10A**). En relación

a los genes que codifican proteínas antioxidantes, encontramos niveles de ARNm aumentados de *Cat* en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC), y este incremento fue prevenido ante la suplementación dietaria materna con aceite de oliva extra virgen ($p < 0,05$ vs. GD) (**Figura 10B**). De manera similar, observamos un aumento en los niveles de ARNm de *Mnsod* en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC), y este incremento fue prevenido ante la suplementación con aceite de oliva extra virgen en la F0 ($p < 0,05$ vs. GD) (**Figura 10C**).

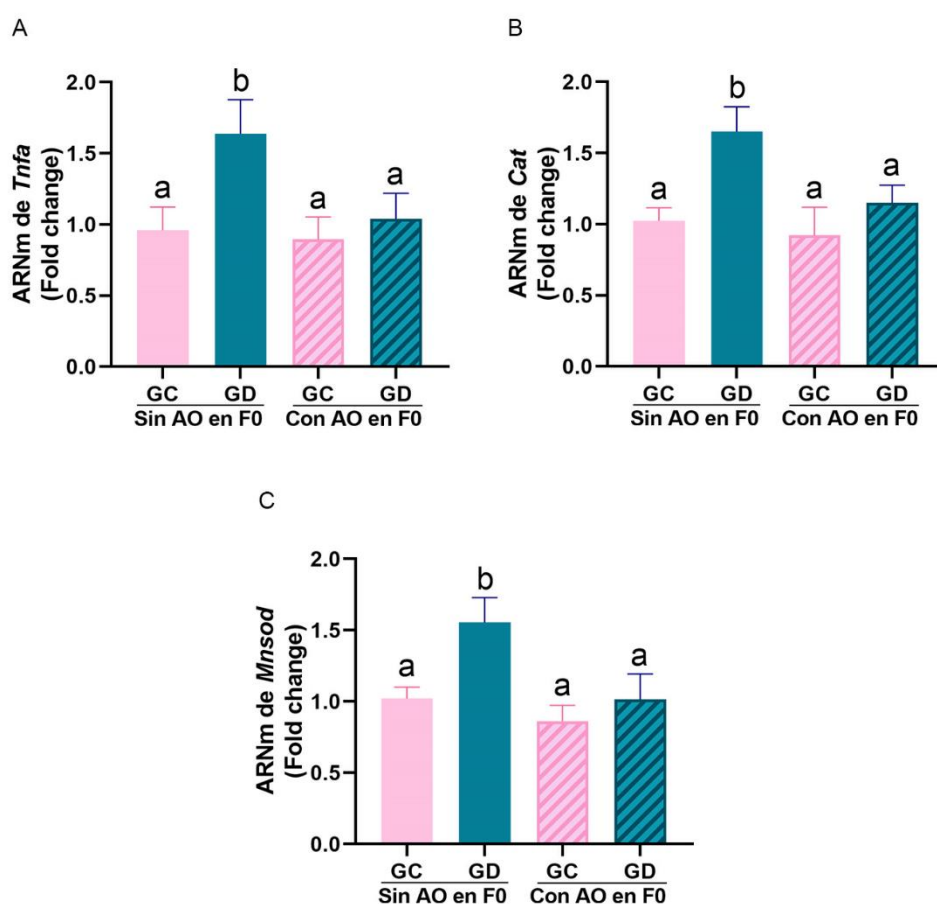


Figura 10: Niveles de ARNm de *Tnfa* (A), *Cat* (B) y *Mnsod* (C) en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. $n = 6-8$. Letras distintas denotan diferencias significativas.

Por otro lado, se sabe que la MMP9, metaloproteasa vinculada a la remodelación tisular (Cabral-Pacheco *et al.*, 2020), es relevante en el útero y su sobre-expresión se vincula a procesos inflamatorios (Lockwood *et al.*, 2008; Higa *et al.*, 2011). Evaluamos los niveles de la MMP9 en cortes histológicos de úteros decidualizados y observamos un aumento significativo en los úteros decidualizados de crías prepúberes de ratas diabéticas en comparación con el control, localizada principalmente en el estroma y en glándulas uterinas ($p < 0,05$ vs. GC). En forma interesante, esta alteración fue prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p < 0,001$ vs. GD) (Figura 11).

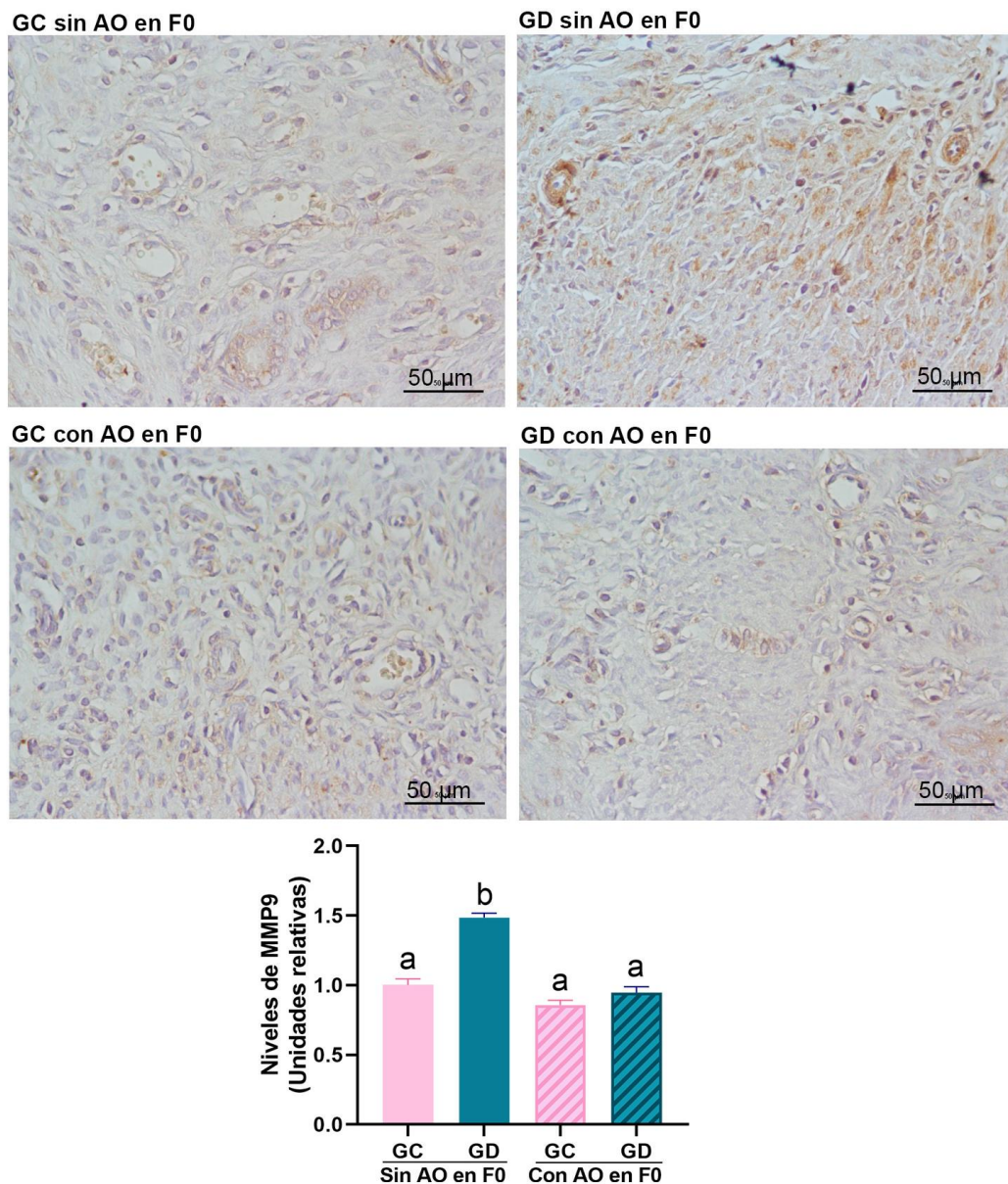


Figura 11: Inmunomarcación de MMP9 en el útero decidualizado de ratas prepúberes

descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. *Letras distintas denotan diferencias significativas*. Aumento 400X (escala 50 μ m).

Además, decidimos evaluar en cortes histológicos los niveles de 4-HNE, producto de la peroxidación lipídica, que puede contribuir a la disfunción celular y al daño tisular en condiciones patológicas (Dham *et al.*, 2021). Observamos un aumento significativo en los niveles de 4-HNE en los úteros decidualizados de crías prepúberes de ratas diabéticas en comparación con el control ($p < 0,01$ vs. GC), y esta alteración también fue prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p < 0,01$ vs. GD) **(Figura 12)**.

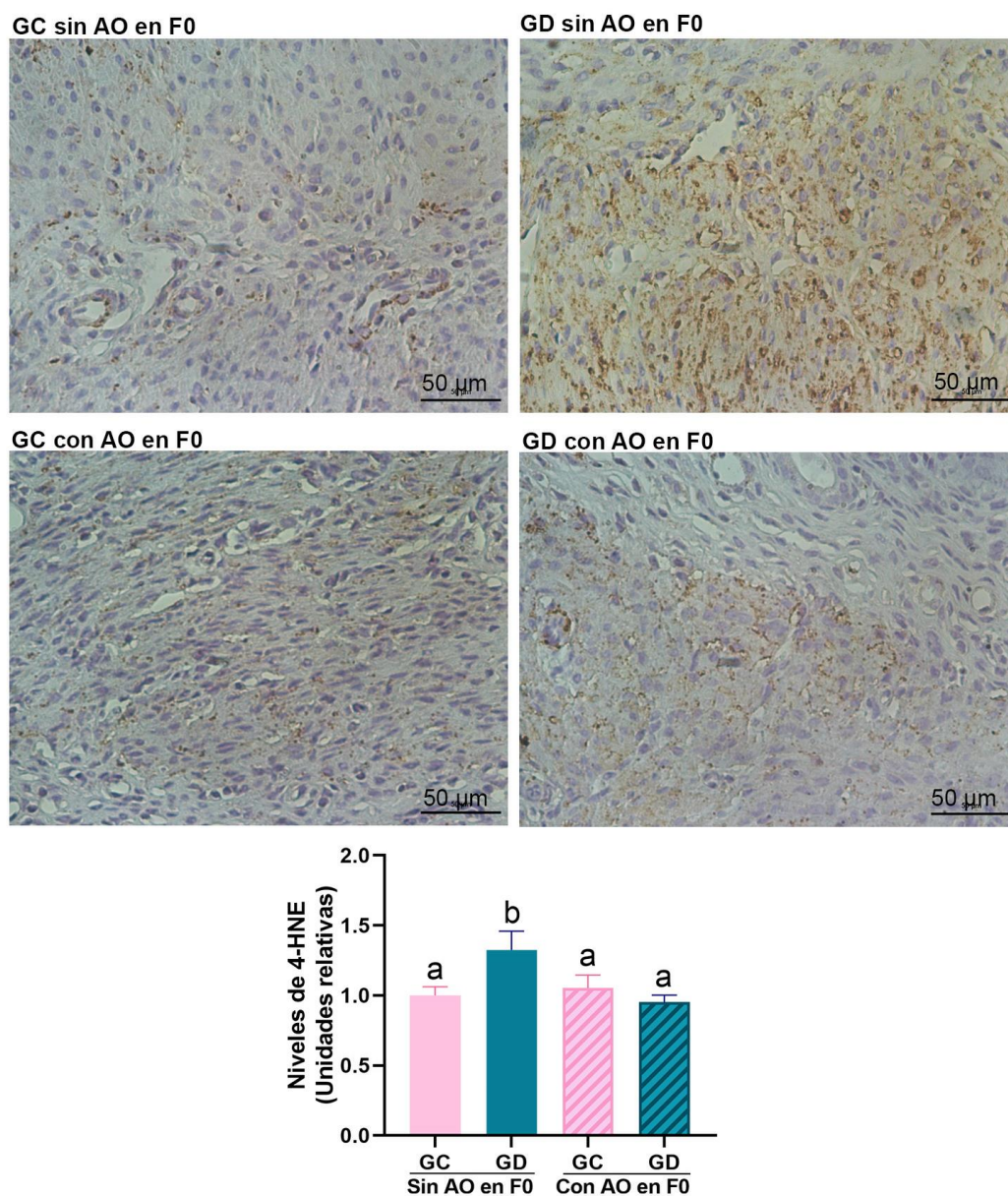


Figura 12: Inmunomarcación de 4-HNE en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. $n = 6-8$. Letras distintas denotan diferencias significativas. Aumento 400X (escala 50 μm).

1.5. Vía de señalización de mTOR en el útero decidualizado de ratas prepúberes

La vía de mTOR es activada principalmente por factores de crecimiento y nutrientes. Una vez activada esta vía de regulación nutricional desencadena una cascada de fosforilaciones que llevan principalmente a la síntesis de proteínas, crecimiento y proliferación celular (Saxton y Sabatini 2017). Se sabe que en la decidua las vías PPAR y mTOR están estrechamente relacionadas (Roberti *et al.*, 2018). Previamente, evaluamos al miR-21 que regula a PPAR α , conociéndose que a su vez este microRNA tiene como diana a los principales inhibidores de la vía mTOR, incluidos PTEN y FOXO1 (Xiong *et al.*, 2013; Go *et al.*, 2015). Por ello, se procedió a evaluar la vía mTOR en los úteros decidualizados de ratas diabéticas cuyas madres fueron alimentadas o no con una dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen.

Los niveles de ARNm de *Mtor* se mantuvieron sin cambios en los grupos evaluados (**Figura 13A**). Sin embargo, encontramos alteraciones en la expresión de los principales reguladores de la actividad de la vía mTOR. Al evaluar los niveles de ARNm de *Pten* encontramos un aumento en los úteros decidualizados de crías de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC), y esta alteración fue prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p < 0,05$ vs. GD) (**Figura 13B**). De manera similar, encontramos un incremento en los niveles del ARNm de *Foxo1* en los úteros decidualizados de crías de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,01$ vs GC), y este aumento se previno cuando las madres recibieron suplemento de aceite de oliva extra virgen ($p < 0,01$ vs. GD) (**Figura 13C**). Además de las alteraciones observadas en la expresión de estos reguladores negativos de la actividad mTOR, los niveles de ARNm de *Pink*, un gen que se encuentra río abajo de la activación de FOXO1 y que está implicado en la homeostasis energética mitocondrial (Li *et al.*, 2017), también mostró un aumento en los úteros decidualizados de crías de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC), alteración que se previno ante la dieta materna enriquecida en aceite de oliva extra virgen ($p < 0,05$ vs. GD) (**Figura 13D**).

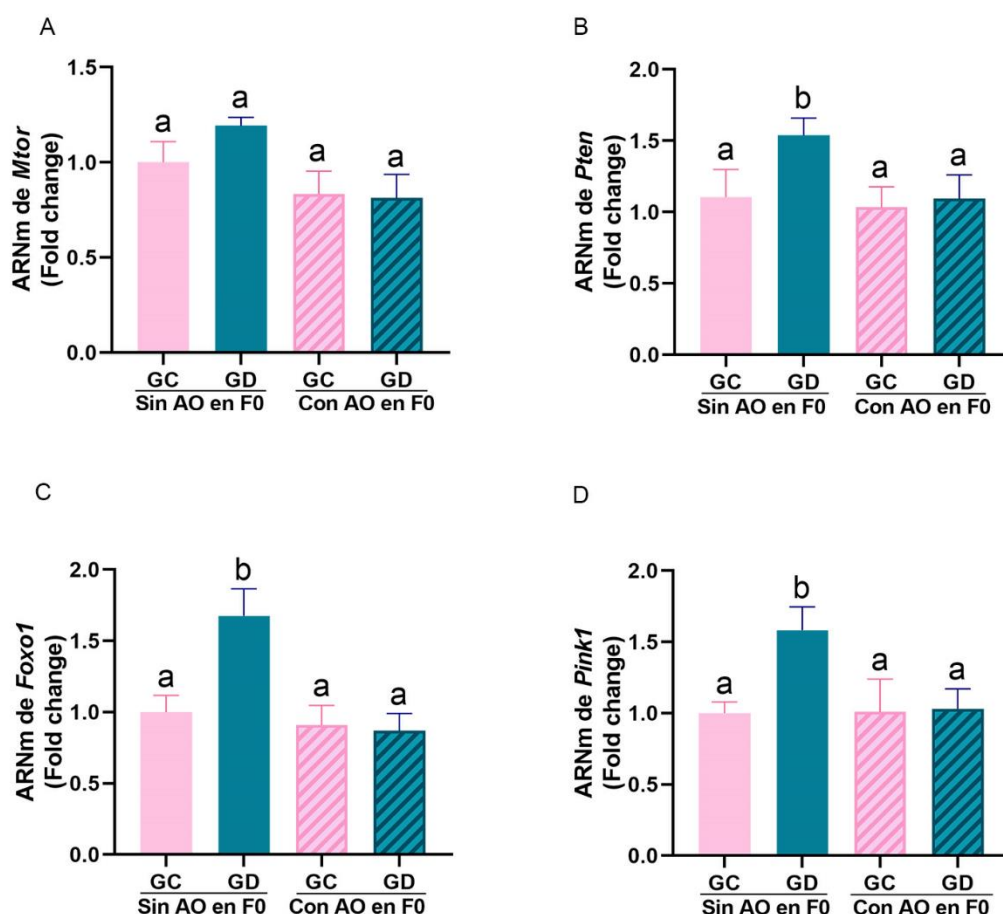


Figura 13: Niveles de ARNm de *Mtor* (A), *Pten* (B), *Foxo1* (C) y *Pink1* (D) en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. *Letras distintas denotan diferencias significativas.*

Finalmente, la actividad de la vía mTOR se evaluó mediante la evaluación de la proteína ribosomal S6 (rpS6) y 4E-BP1 fosforilada y total, proteínas que se fosforilan cuando se activa la vía mTORC1 (Laplanche y Sabatini 2013). Encontramos reducidos niveles de rpS6 fosforilada en los úteros decidualizados de las crías de ratas diabéticas ($p < 0,01$ vs. GC), alteración que fue prevenida por la dieta materna suplementada en aceite de oliva extra virgen ($p < 0,05$ vs. GD) (**Figura 14A**). Además, no observamos cambios en los niveles totales de rpS6 en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas que recibieron o no suplemento de aceite de oliva extra virgen en la F0 (**Figura 14B**). La relación de rpS6 fosforilado/rpS6 total mostró una reducción en los úteros decidualizados de las crías de ratas diabéticas ($p < 0,01$ vs. GC),

alteración que fue prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p < 0,05$ vs. GD) (**Figura 14C**).

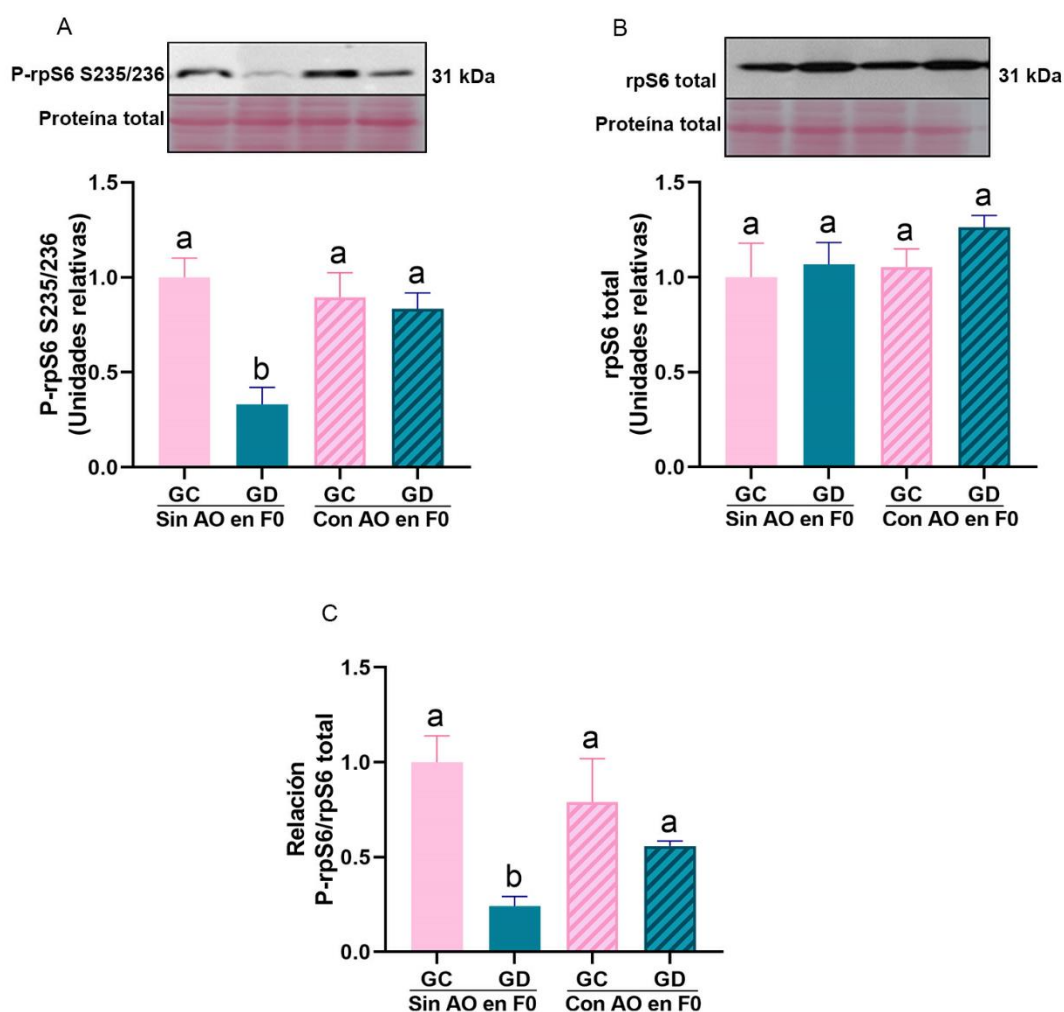


Figura 14: Niveles proteicos de las formas fosforiladas (A) y total (B) de rpS6 y la relación entre las formas fosforilada y total (C) en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. $n = 6-8$. *Letras distintas denotan diferencias significativas.*

Por otro lado, los niveles de 4E-BP1 fosforilado también disminuyeron en los úteros decidualizados de crías de ratas diabéticas ($p < 0,01$ vs GC), alteración que fue prevenida ante el suplemento de aceite de oliva extra virgen en la dieta materna ($p < 0,05$ vs. GD) (**Figura 15A**). Además, no observamos cambios en los niveles totales de 4E-BP1 en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas con o sin

suplemento de aceite de oliva extra virgen en la F0 (**Figura 15B**). Finalmente, la relación de 4E-BP1 fosforilado/4E-BP1 total mostró una reducción en los úteros decidualizados de las crías de ratas diabéticas ($p<0,01$ vs. GC), alteración que fue prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen ($p<0,05$ vs. GD) (**Figura 15C**).

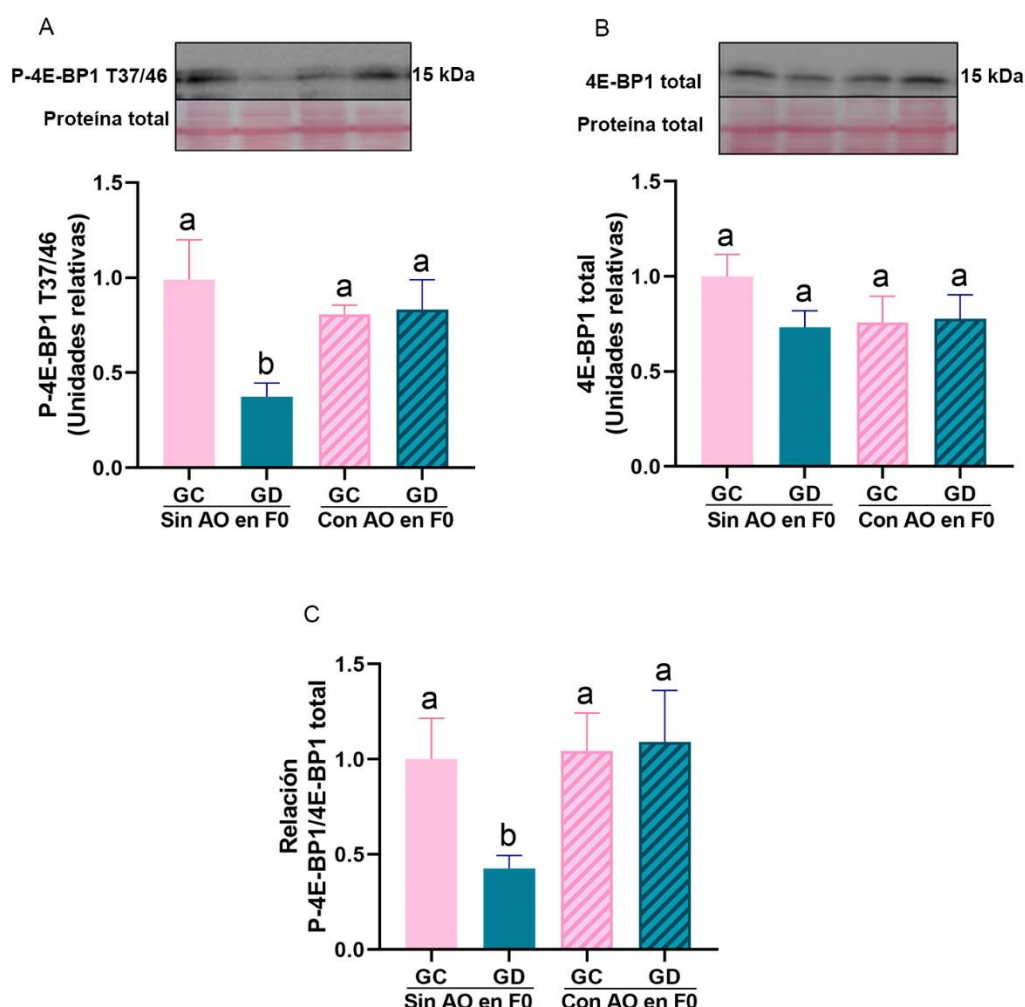


Figura 15: Niveles proteicos de las formas fosforiladas (A) y total (B) de 4E-BP1 y la relación entre las formas fosforilada y total (C) en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. $n=6-8$. Letras distintas denotan diferencias significativas.

Los resultados mostrados en este primer capítulo nos demuestran que en este modelo de diabetes pregestacional se induce programación de alteraciones en el útero de la descendencia de ratas diabéticas en la etapa prepuberal, viéndose afectados múltiples

marcadores del proceso de decidualización y de función decidual. Además, pudimos ver que la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen tiene efecto intergeneracional cobrando relevancia su capacidad de prevención de alteraciones en el útero decidualizado de la descendencia de ratas diabéticas en etapa prepuberal. Esto nos llevó a evaluar a la decidua de la F1 en etapa de gestación temprana en el día 9 de preñez, período donde la función decidual es fundamental para el posterior establecimiento de la placenta y el desarrollo fetal.

Capítulo 2:

Efecto de la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen en la decidua de ratas (F1) en el día 9 de gestación, descendientes de ratas diabéticas (F0).

Sabemos que la diabetes materna pregestacional (caracterizada por hiperglucemia previa al embarazo) afecta profundamente al desarrollo del embrión durante la organogénesis temprana (Mori *et al.*, 2016), etapa en que la decidua cumple una importante función en aspectos nutricionales, inmunológicos y de desarrollo del embrión y de la placenta (Mori *et al.*, 2016; Ng *et al.*, 2020). Estudios previos de nuestro laboratorio, mostraron que en modelos experimentales de diabetes pregestacional la decidua se encuentra profundamente afectada, y presenta alteraciones marcadas por elevados niveles de factores prooxidantes y proinflamatorios, y reducidos niveles de los PPAR (Higa *et al.*, 2014; Roberti *et al.*, 2021). Estos receptores nucleares son cruciales en procesos de desarrollo y metabólicos y en la regulación de vías antioxidantes y antiinflamatorias (Jawerbaum y Capobianco 2011; Wahli y Michalik 2012).

En el contexto de este trabajo de tesis, en la descendencia de ratas con diabetes pregestacional que presentan alteraciones en el útero decidualizado en la etapa prepuberal, nos resultó de interés estudiar la gestación en el período de postimplantación, analizando posibles cambios deciduales en las vías de los PPAR y sus procesos regulatorios asociados, que se postula podrían evidenciarse previo al diagnóstico de diabetes gestacional, evidente en este modelo experimental a término de la preñez, y que podrían afectar el desarrollo embrionario y placentario.

2.1. Glucemias, número de embriones implantados y tasa de reabsorciones embrionarias en ratas F1, en el día 9 de gestación

Iniciamos esta segunda parte del trabajo analizando las glucemias de ratas de la F1 en el día 9 de gestación, descendientes de ratas controles (GC) o diabéticas (GD) que fueron apareadas con machos sanos. Nuestros trabajos previos mostraron que las crías de ratas con diabetes pregestacional, desarrollan diabetes gestacional en la gestación a término por programación intrauterina (Capobianco *et al.*, 2016). En este estudio, al analizar la gestación temprana, observamos que las crías de ratas diabéticas en el día 9 de gestación mostraron normoglucemia cuando las madres fueron alimentadas tanto con dieta estándar como con dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen (**Tabla 7**).

Luego, evaluamos en el día 9 de gestación, el número de embriones implantados y no encontramos diferencias significativas en la descendencia de ratas con diabetes pregestacional en relación al control, tanto cuando las madres recibieron o no suplemento en la dieta de aceite de oliva extra virgen (**Tabla 7**). Además, calculamos la tasa de reabsorciones embrionarias y no encontramos diferencias significativas en la descendencia de ratas diabéticas en relación al control, tanto cuando sus madres fueron alimentadas con dieta estándar o con dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen durante la gestación (**Tabla 7**).

Por otro lado, evaluamos los niveles séricos de progesterona y no encontramos diferencias significativas en la descendencia de ratas diabéticas en relación al control, tanto cuando sus madres fueron alimentadas con dieta estándar o con dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen durante la gestación (**Tabla 7**).

	DESCENDENCIA GRUPO CONTROL	DESCENDENCIA GRUPO DIABÉTICO	DESCENDENCIA GRUPO CONTROL CON SUPLEMENTO DE AO	DESCENDENCIA GRUPO DIABÉTICO CON SUPLEMENTO DE AO
GLUCEMIA MATERNA DÍA 9 (mg/dl)	102 ± 12 ^a	107 ± 8 ^a	108 ± 18 ^a	98 ± 5 ^a
NRO. DE EMBRIONES IMPLANTADOS	16,8 ± 0,5 ^a	15,4 ± 0,7 ^a	15 ± 0,6 ^a	15,4 ± 0,9 ^a
TASA DE REABSORCIONES EMBRIONARIAS (%) (Reabsorciones/sitios de implantación totales)	2,5% ^a (3/121)	5,5% ^a (6/108)	4,6% ^a (4/105)	3,6% ^a (3/110)
NIVELES DE PROGESTERONA (ng/ml)	46,6 ± 3,4 ^a	47,8 ± 3,4 ^a	46,5 ± 2,2 ^a	46,9 ± 3,7 ^a

Tabla 7. Glucemia materna (F1), número de embriones implantados por rata, tasa de reabsorciones embrionarias y niveles de progesterona en el día 9 de gestación de ratas descendientes de ratas controles (GC) y diabéticas (GD), que recibieron o no suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) durante la gestación F0. Análisis estadístico para glucemia y niveles de progesterona: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni, n= 6-8. *Letras distintas denotan diferencias significativas.* Análisis estadístico para número de embriones y tasa de reabsorciones embrionarias: prueba de chi-cuadrado, n=6-8. *Letras distintas denotan diferencias significativas.*

2.2. Marcadores de decidualización, niveles de los PPAR y de microRNAs que los regulan en la decidua de la F1 en el día 9 de gestación

Inicialmente, como marcador de decidualización evaluamos los niveles de ARNm de prolactina (*Prl*) y encontramos una reducción significativa en la decidua de ratas descendientes de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC). Esta reducción en los niveles de *Prl* no se vio modificada cuando las madres recibieron el suplemento de aceite de oliva extra virgen brindado en la gestación F0 (**Figura 16A**). De manera similar, al evaluar los niveles de ARNm del receptor de prolactina (*rPrl*), encontramos una reducción en sus niveles en la decidua de ratas descendientes de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC), y esa alteración no se vio modificada ante el suplemento materno de aceite de oliva extra virgen (**Figura 16B**).

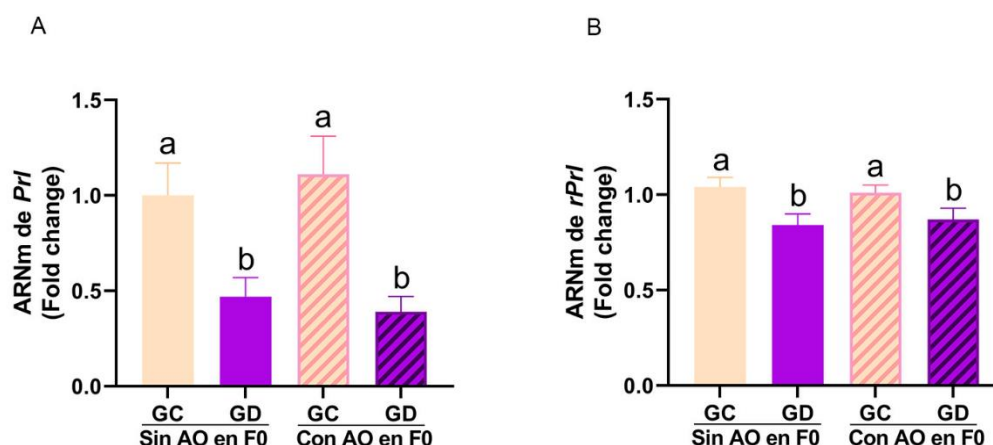


Figura 16: Niveles de ARNm de *Prl* (A) y de *rPrl* (B) en la decidua en el día 9 de gestación de ratas descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. *Letras distintas denotan diferencias significativas.*

Además, como marcador de decidualización también evaluamos los niveles de FABP4 en cortes histológicos de la decidua en el día 9 de gestación. Observamos un aumento significativo de FABP4 en la decidua de ratas descendientes de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,01$ vs. GC) y esta alteración fue prevenida ante el suplemento de aceite de oliva extra virgen brindado en la gestación F0 ($p < 0,01$ vs. GD) (**Figura 17**).

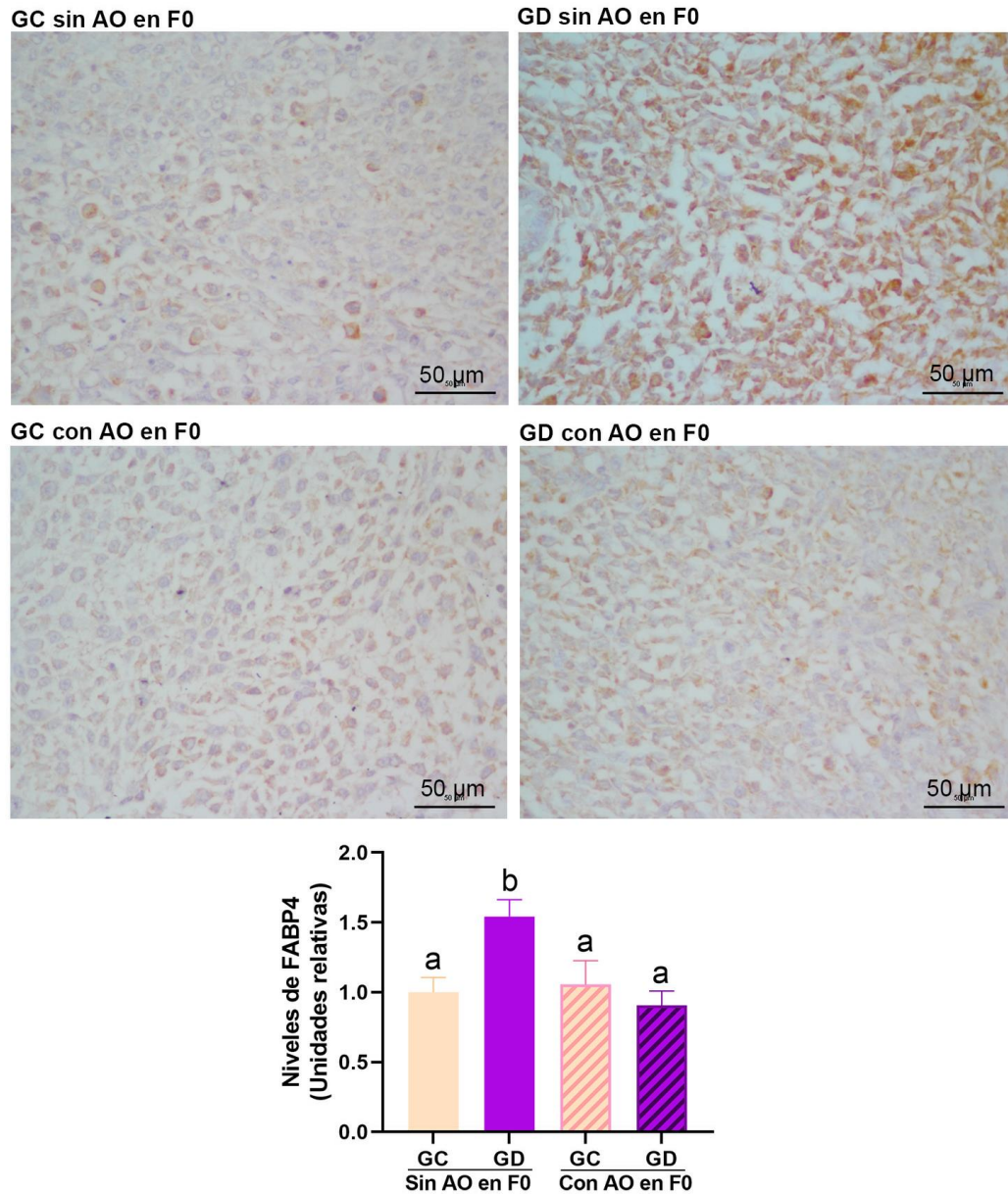


Figura 17: Inmunomarcación de FABP4 en la decidua en el día 9 de gestación de ratas descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. $n = 6-8$. *Letras distintas denotan diferencias significativas.* Aumento 400X (escala 50 μm).

A continuación, evaluamos los niveles de los tres isotipos de los PPAR y de los microRNAs que los regulan. Al evaluar los niveles proteicos de PPAR α en la decidua de la F1 en el día 9 de gestación, encontramos sus niveles reducidos en la decidua de la descendencia de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,01$ vs. GC). Sin embargo, esta reducción no es significativa cuando las madres recibieron en la gestación F0 el suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (**Figura 18A**). Luego, evaluamos los niveles de miR-21, regulador negativo de *Ppara*, y observamos un incremento en la decidua de la descendencia de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,01$ vs. GC), alteración que persiste cuando las madres recibieron en la gestación F0 el suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (**Figura 18B**).

A continuación, al evaluar los niveles proteicos de PPAR γ encontramos una reducción de los mismos en la decidua en el día 9 de gestación de la descendencia de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC), alteración que persiste cuando las madres recibieron en la gestación F0 el suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (**Figura 18C**). Además, al evaluar los niveles del miR-19b, regulador negativo de *Pparg*, encontramos un incremento en la decidua de crías de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,01$ vs. GC), alteración que persiste cuando las madres recibieron en la gestación F0 el suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (**Figura 18D**).

Por otro lado, al evaluar los niveles proteicos de PPAR δ en la decidua en el día 9 de gestación observamos niveles disminuidos de este isotipo de PPAR en la decidua de la descendencia de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,01$ vs. GC), alteración que persiste cuando las madres recibieron en la gestación F0 el suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (**Figura 18E**). Luego, evaluamos los niveles del miR-122, regulador negativo de *Ppard* y observamos un incremento en la decidua de la descendencia de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,01$ vs. GC), alteración que persiste cuando las madres recibieron en la gestación F0 el suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (**Figura 18F**).

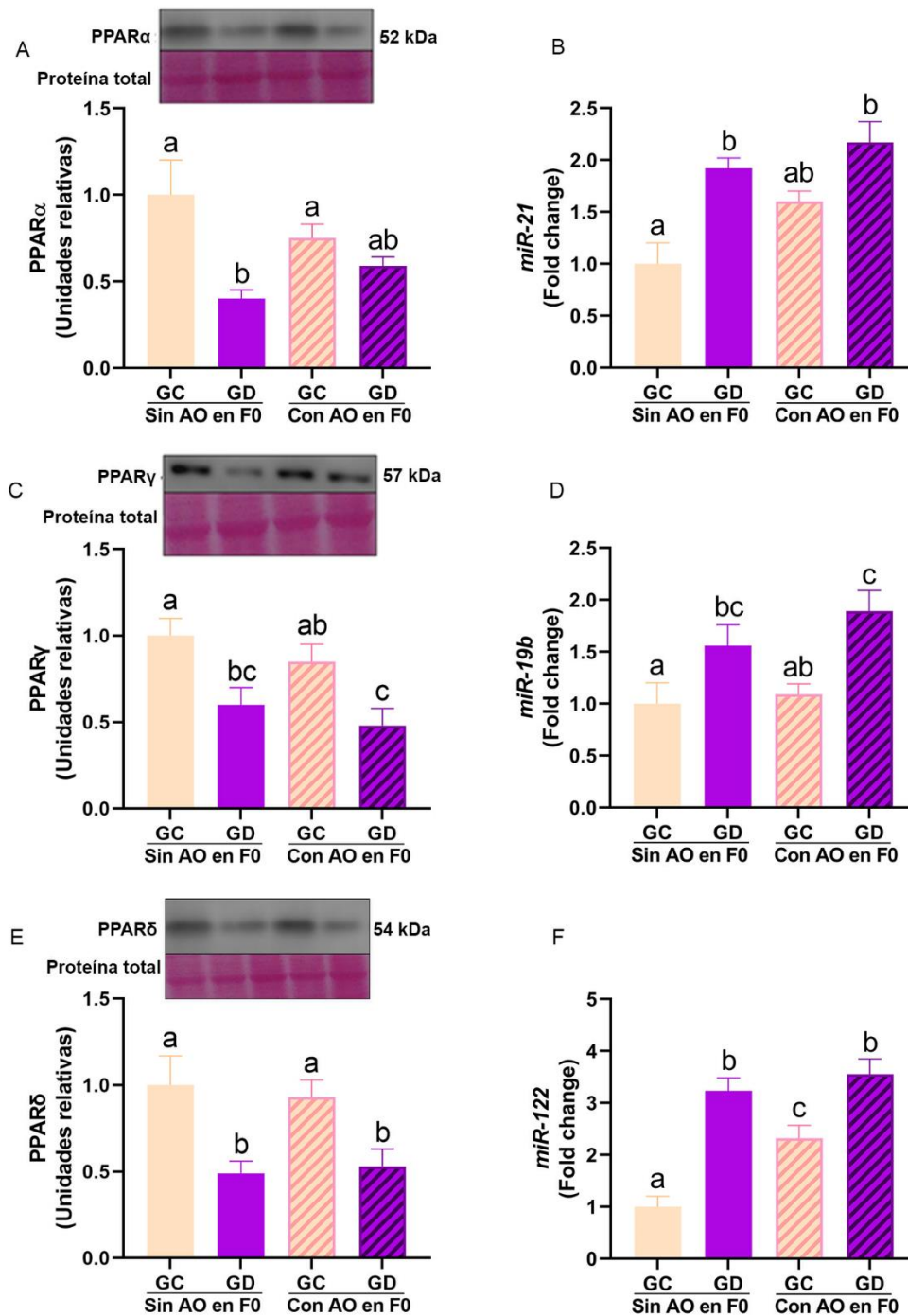


Figura 18: Niveles de proteicos de PPAR α (A) y niveles de ARN del miR-21 (B), de PPAR γ (C) y del miR-19b (D), y de PPAR δ (E) y del miR-122 (F) en la decidua de ratas en el día 9 de gestación descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. *Letras distintas denotan diferencias significativas.*

2.3. Vías prooxidantes y proinflamatorias en la decidua de la F1 en el día 9 de gestación

En relación al entorno prooxidante, evaluamos los niveles de 4-HNE en la decidua en el día 9 de gestación y encontramos un aumento significativo en la decidua de ratas descendientes de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,01$ vs. GC) y esta alteración fue prevenida ante el suplemento de aceite de oliva extra virgen brindado en la gestación F0 ($p < 0,01$ vs. GD) (**Figura 19**).

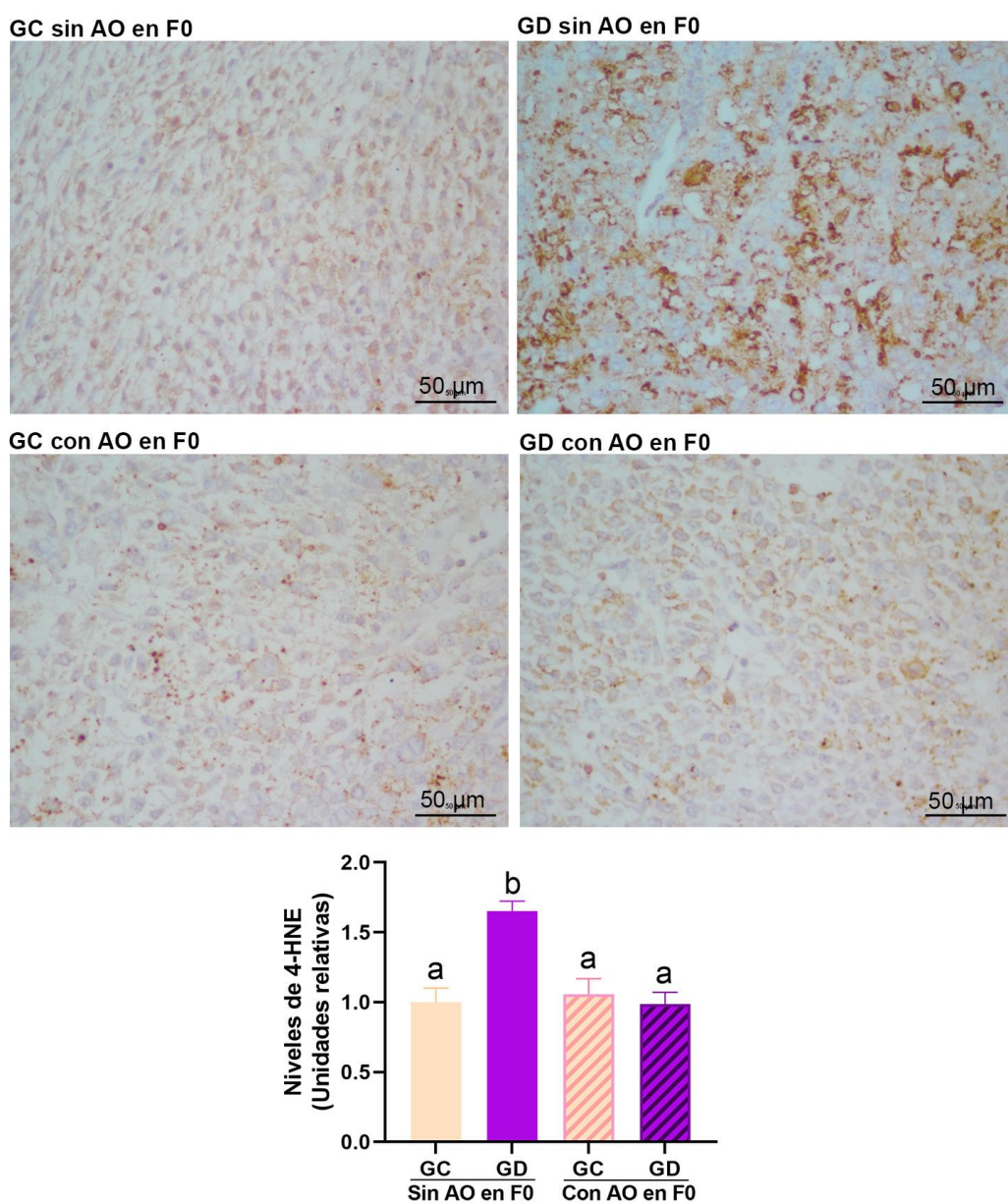


Figura 19: Inmunomarcación de 4-HNE en la decidua en el día 9 de gestación de ratas descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento

dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. *Letras distintas denotan diferencias significativas*. Aumento 400X (escala 50 μ m).

A continuación, evaluamos la expresión de *Cat* y *Mnsod*, dos genes que codifican proteínas antioxidantes. Por un lado, encontramos que los niveles de ARNm de *Cat* no se modificaron en la decidua de ratas descendientes de ratas diabéticas. Sin embargo, observamos un aumento significativo de los niveles de ARNm de *Cat* en la decidua de ratas descendientes de ratas diabéticas ante suplemento dietario materno con aceite de oliva extra virgen en relación tanto al grupo diabético como al control que no recibieron la suplementación dietaria ($p<0,05$ vs. GD y $p<0,05$ vs. GC) (**Figura 20A**). Luego, con respecto a MnSOD, no observamos cambios en los niveles de ARNm de *Mnsod* en la decidua de ratas descendientes de ratas diabéticas en relación al control, con o sin suplemento de aceite de oliva extra virgen brindado a las madres durante la gestación F0 (**Figura 20B**).

Por otro lado, en relación al entorno proinflamatorio evaluamos a la interleuquina- 1β , y no encontramos cambios en los niveles de ARNm de *Il-1b* en la decidua de ratas descendientes de ratas diabéticas en relación al control, con o sin suplemento materno de aceite de oliva extra virgen (**Figura 20C**).

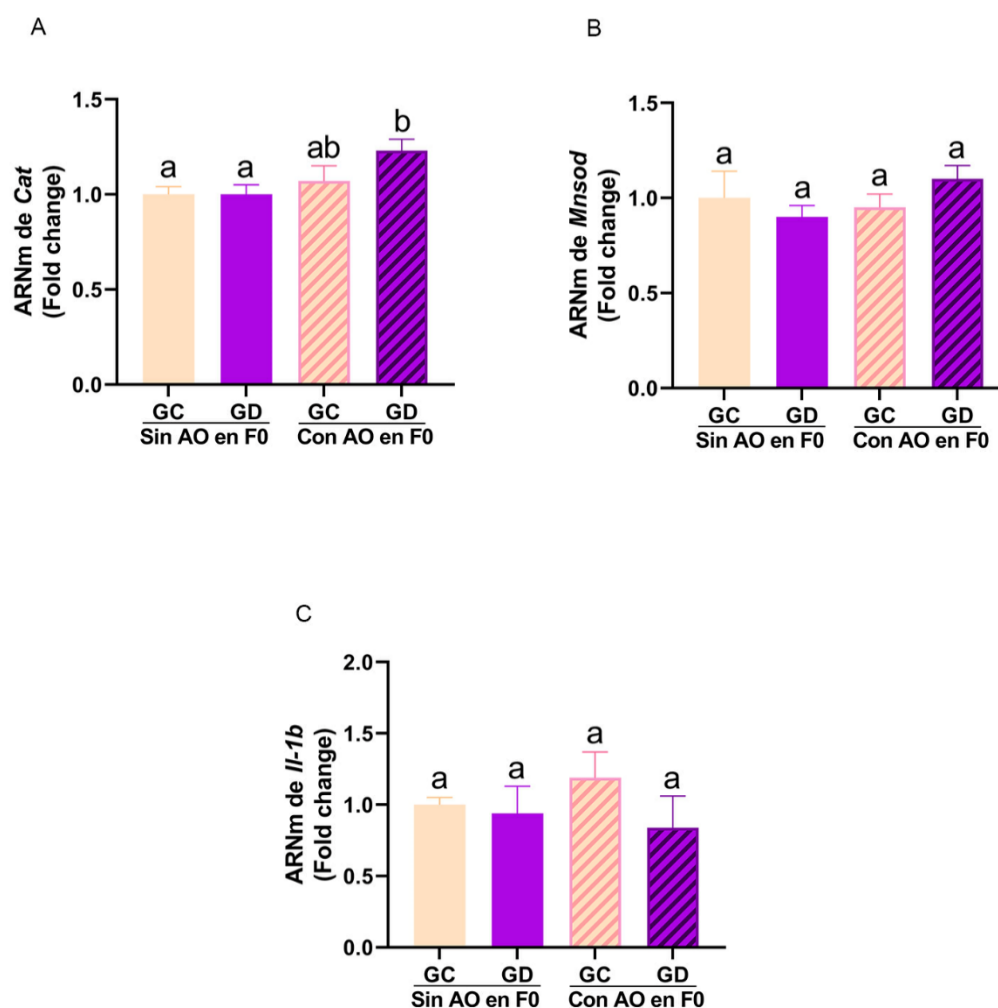


Figura 20: Niveles de ARNm de *Cat* (A), de *Mnsod* (B) y de *Il-1b* (C) en la decidua de ratas en el día 9 de gestación, descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. *Letras distintas denotan diferencias significativas.*

2.4. Vía de señalización de mTOR en la decidua de la F1 en el día 9 de gestación

Finalmente, evaluamos la actividad de la vía mTOR mediante la evaluación de la proteína ribosomal S6 (rpS6) y 4E-BP1 fosforilada y total, proteínas que se fosforilan cuando se activa la vía mTORC1 (Laplane y Sabatini 2013).

En la decidua de la F1 en el día 9 de gestación encontramos niveles reducidos de rpS6 fosforilado en la descendencia de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs.

GC), alteración que persiste ante la dieta materna suplementada en aceite de oliva extra virgen brindada en la F0 (**Figura 21A**). Además, no observamos cambios en los niveles totales de rpS6 en la decidua de la F1 en la descendencia de ratas diabéticas que recibieron o no suplemento de aceite de oliva extra virgen en la gestación F0 (**Figura 21B**). La relación de rpS6 fosforilado/rpS6 total mostró una reducción en la decidua en el día 9 de gestación en las crías de ratas diabéticas ($p < 0,05$ vs. GC), que persiste ante la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen brindada en la F0 (**Figura 21C**).

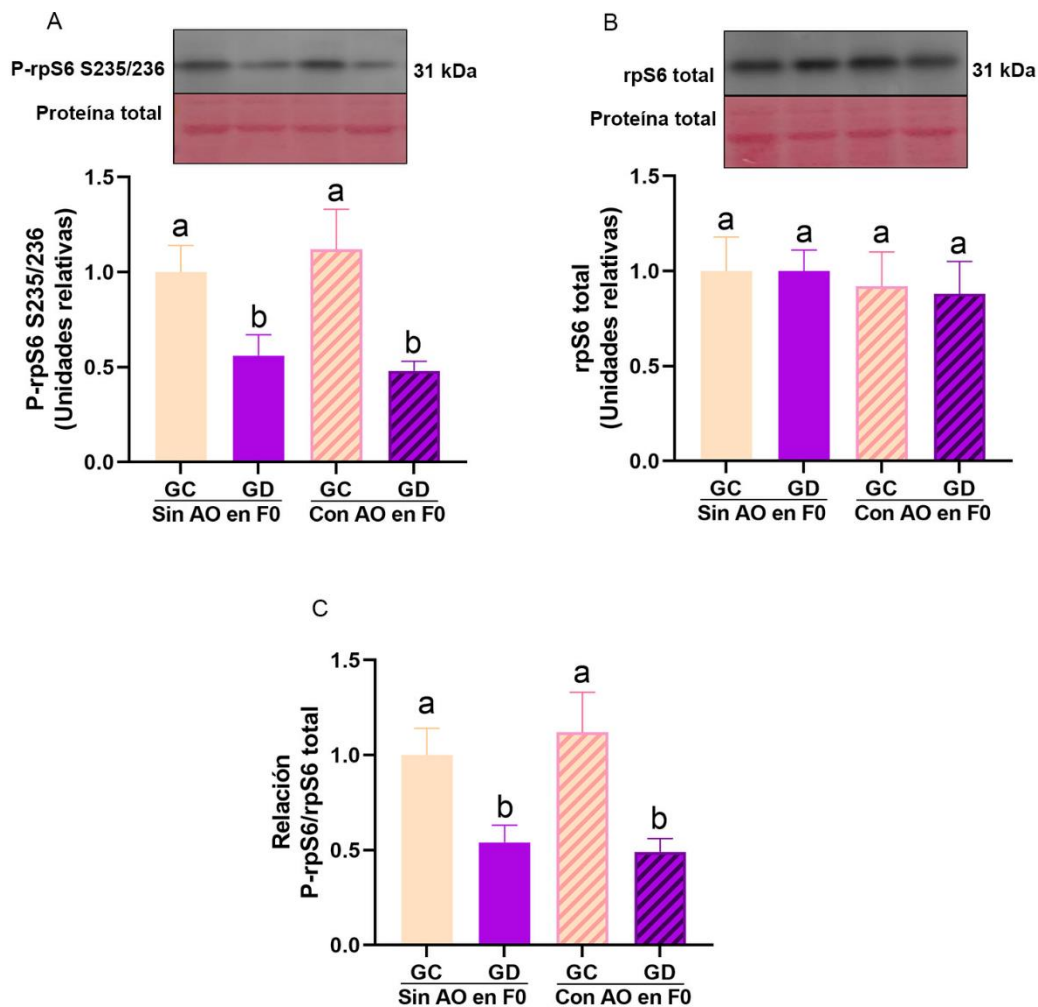


Figura 21: Niveles proteicos de las formas fosforiladas (A) y total (B) de rpS6 y la relación entre las formas fosforilada y total (C) en la decidua de ratas en el día 9 de gestación descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. $n = 6-8$. Letras distintas denotan diferencias significativas.

Por otro lado, los niveles de 4E-BP1 fosforilado también disminuyeron en la decidua en el día 9 de gestación en la descendencia de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC), alteración que persiste ante el suplemento de aceite de oliva extra virgen brindado en la gestación F0 (**Figura 22A**). En paralelo, observamos una reducción en los niveles totales de 4E-BP1 en la decidua en el día 9 de gestación de crías de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC), que persiste ante el suplemento de aceite de oliva extra virgen brindado en la gestación F0 (**Figura 22B**). Por ello, no observamos cambios en la relación 4E-BP1 fosforilado/4E-BP1 total en la decidua de la F1 de las crías de ratas diabéticas que recibieron o no suplemento de aceite de oliva extra virgen en la gestación F0 (**Figura 22C**).

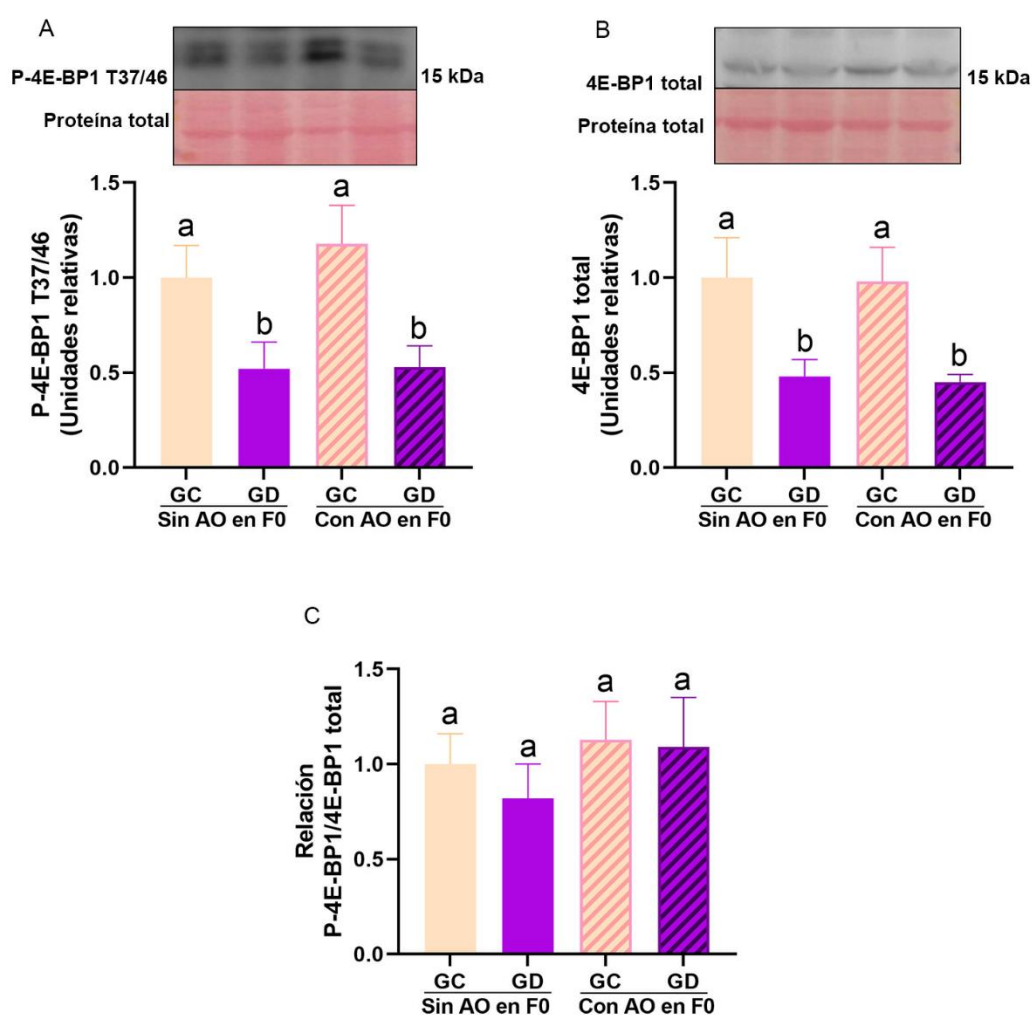


Figura 22: Niveles proteicos de las formas fosforiladas (A) y total (B) de 4E-BP1 y la relación entre las formas fosforilada y total (C) en la decidua de ratas en el día 9 de gestación descendientes de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de

oliva extra virgen (AO) en la gestación F0. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. *Letras distintas denotan diferencias significativas.*

Los resultados mostrados en este segundo capítulo nos demuestran que en este modelo de diabetes pregestacional se induce programación de alteraciones en la decidua de la descendencia de ratas diabéticas en la etapa de gestación temprana. La dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen pudo prevenir la programación de algunas alteraciones en marcadores del proceso de decidualización y función decidual, y redujo el entorno prooxidante en la decidua de ratas descendientes de ratas diabéticas en el día 9 de gestación. Dado que las alteraciones evidenciadas se programan en forma intrauterina, nos interesó continuar el estudio identificando posibles anomalías evidenciadas en el útero de fetos en la gestación de ratas con diabetes pregestacional (F0) que programa las anomalías uterinas identificadas en la decidua de la F1.

Capítulo 3:

Efecto de la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen en el útero de fetos de ratas con diabetes en el día 21 de gestación.

Considerando que, en patologías gestacionales como la diabetes materna, el útero del feto se desarrolla expuesto al adverso entorno intrauterino (Mori *et al.*, 2016; Hivert *et al.*, 2024), surge como hipótesis que, en la etapa fetal, el útero es un órgano susceptible al ambiente intrauterino adverso de la gestación de la F0, donde se inducen cambios vinculados con la adversa programación, que se evidencian en la gestación de la F1. En los capítulos previos, observamos que el adverso entorno prooxidante, tanto en el útero decidualizado en etapa prepuberal como en la decidua de la descendencia de ratas con diabetes, se previene al realizar tratamientos maternos en la gestación de la F0 con dietas ricas en aceite de oliva extra virgen, por lo que nos resultó importante evidenciar si esta dieta enriquecida tiene efectos benéficos a nivel del útero fetal en la gestación de la F0.

3.1. Glucemias fetales

Al iniciar este tercer capítulo, evaluamos las glucemias de los fetos al día 21 de gestación de ratas sanas y diabéticas. Encontramos que los fetos hembra y macho de ratas diabéticas presentaron elevados niveles de glucemia en relación al control ($p < 0,01$ vs. GC). Este aumento en los niveles de glucemia no se vio modificado cuando las madres fueron alimentadas con una dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen durante la gestación (**Tabla 8**).

GLUCEMIA (mg/dl)	GRUPO CONTROL	GRUPO DIABÉTICO	GRUPO CONTROL CON SUPLEMENTO DE AO	GRUPO DIABÉTICO CON SUPLEMENTO DE AO
(F1) FETOS HEMBRA DÍA 21 DE GESTACIÓN	56 ± 4^a	189 ± 27^b	56 ± 3^a	227 ± 46^b
(F1) FETOS MACHO DÍA 21 DE GESTACIÓN	53 ± 3^a	189 ± 19^b	55 ± 5^a	222 ± 50^b

Tabla 8. Glucemia de fetos hembra y machos al día 21 de gestación de ratas del grupo control (GC) y del grupo diabético (GD), que recibieron o no suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) durante la gestación. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. $n = 6-8$. Letras distintas denotan diferencias significativas.

3.2. Prolactina y FABP4 en el útero fetal

A continuación, evaluamos los niveles de PRL en cortes histológicos de útero fetal. Observamos niveles reducidos de PRL en el epitelio luminal del útero fetal de crías de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC). Sin embargo, esta reducción no es significativa cuando las madres recibieron el suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (**Figura 23**).

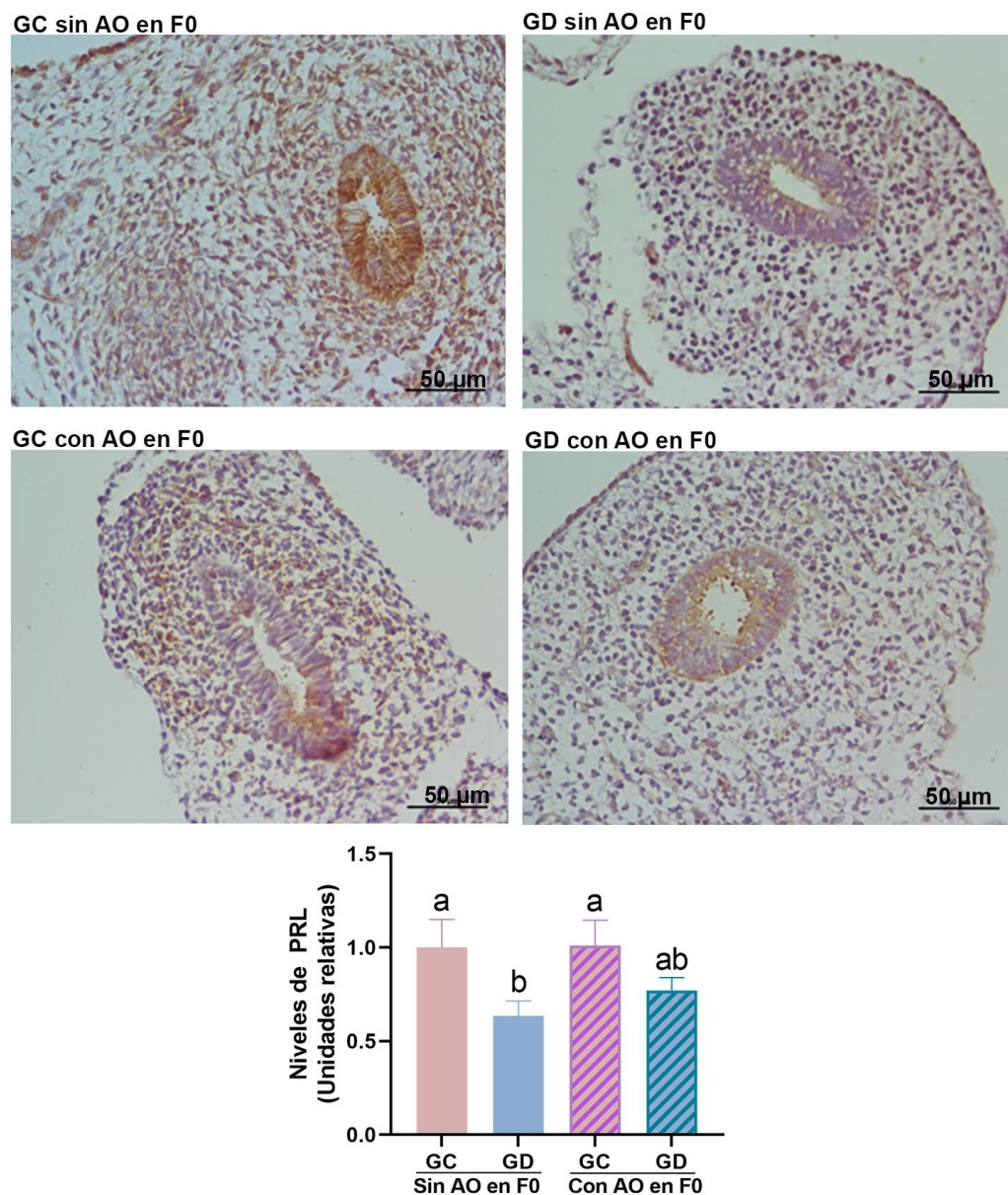


Figura 23: Inmunomarcación de PRL en el útero de fetos de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. $n = 6-8$. Letras distintas denotan diferencias significativas. Aumento 400X (escala 50 μm).

Luego, evaluamos los niveles de ARNm del receptor de prolactina (*rPrI*), el cual se expresa en varios tejidos en etapa fetal y es importante en la regulación del desarrollo de varios órganos (Freemark *et al.*, 1995). Encontramos una reducción de los niveles de *rPrI* en el útero de fetos de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC), y que esta alteración se previno ante la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen brindada durante la gestación F0 ($p < 0,05$ vs. GD) (**Figura 24A**). A continuación,

evaluamos los niveles de ARNm de *Fabp4*, importante en la gestación en el transporte placentario de ácidos grasos entre los tejidos maternos y fetales (Rodríguez-Cruz *et al.*, 2016). No encontramos diferencias significativas en los niveles de ARNm de *Fabp4* en el útero de fetos de ratas diabéticas, tanto cuando sus madres fueron alimentadas con dieta estándar como con dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen en relación al control (**Figura 24B**).

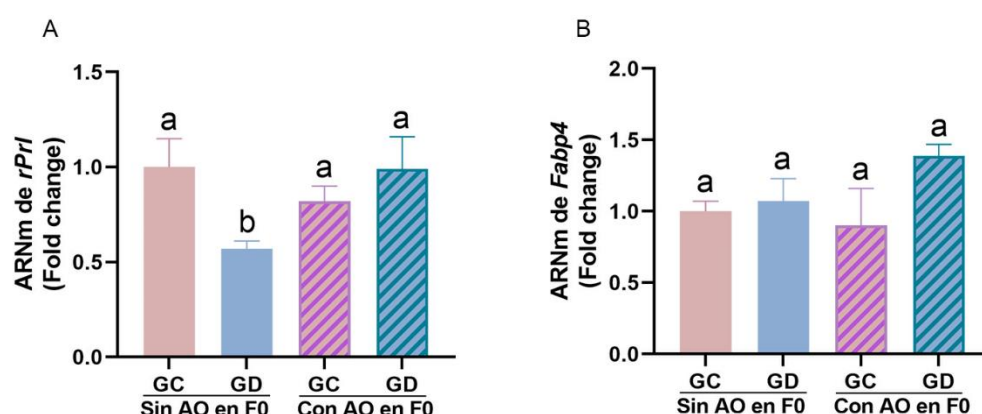


Figura 24: Niveles de ARNm de *rPrl* (A) y *Fabp4* (B) en el útero de fetos de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. Letras distintas denotan diferencias significativas.

3.3. Niveles de ARNm de los PPAR y de microRNAs que los regulan en el útero fetal

A continuación, evaluamos los niveles de ARNm de los tres isotipos de los PPAR y su regulación por microRNAs en el útero fetal. Con respecto a *Ppara*, no encontramos cambios en sus niveles de ARNm en el útero fetal de ratas diabéticas en relación al control, tanto si las madres recibieron dieta estándar como cuando recibieron dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen durante la gestación F0 (**Figura 25A**). Luego, evaluamos los niveles de miR-21, regulador negativo de *Ppara*, y encontramos que sus niveles se mantuvieron sin cambios en el útero fetal de ratas diabéticas en relación al control, tanto si las madres recibieron o no suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (**Figura 25B**). Previamente, mencionamos que este microRNA tiene

como diana a los principales inhibidores de la vía mTOR, incluidos PTEN y FoxO1 (Xiong *et al.*, 2013; Go *et al.*, 2015). Al evaluar los niveles de ARNm de *Pten* y *Foxo1* en el útero fetal, encontramos que los niveles de ARNm de *Pten* no presentaron cambios en el útero fetal de ratas diabéticas que recibieron o no suplemento de aceite de oliva extra virgen en relación al control (**Figura 25C**). Tampoco encontramos cambios en los niveles de ARNm de *Foxo1* en el útero fetal de ratas diabéticas que fueron alimentadas con dieta estándar o con dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen durante la gestación F0 en relación al control (**Figura 25D**).

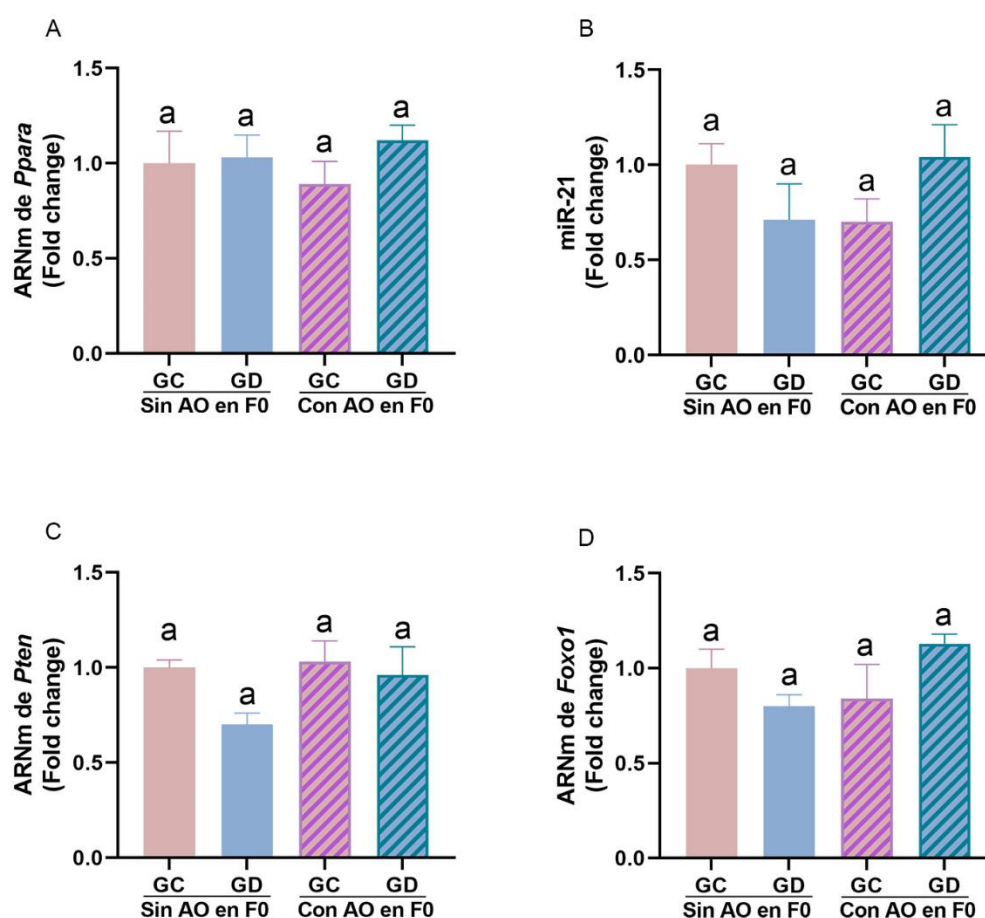


Figura 25: Niveles de ARNm de *Ppara* (A), del miR-21 (B), de *Pten* (C) y de *Foxo1* (D) en el útero de fetos de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. Letras distintas denotan diferencias significativas.

Por otro lado, cuando evaluamos los niveles de ARNm de *Pparg* observamos una reducción en los niveles de este PPAR en el útero de fetos de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,05$ vs. GC), y que esta alteración persiste ante la dieta materna

suplementada con aceite de oliva extra virgen (**Figura 26A**). A continuación, evaluamos los niveles del miR-19b y miR-155, que regulan negativamente la expresión de PPAR γ . Encontramos un aumento en los niveles del miR-19b en el útero de fetos de ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,01$ vs. GC), y que esta alteración persiste ante la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen (**Figura 26B**). Con respecto al miR-155, sus niveles tienden a incrementar en el útero de fetos de ratas diabéticas en relación al control. Además, observamos un aumento significativo del miR-155 en el útero de fetos de ratas diabéticas que recibieron suplemento en la dieta de aceite de oliva extra virgen en relación al control ($p < 0,01$ vs. GC) (**Figura 26C**).

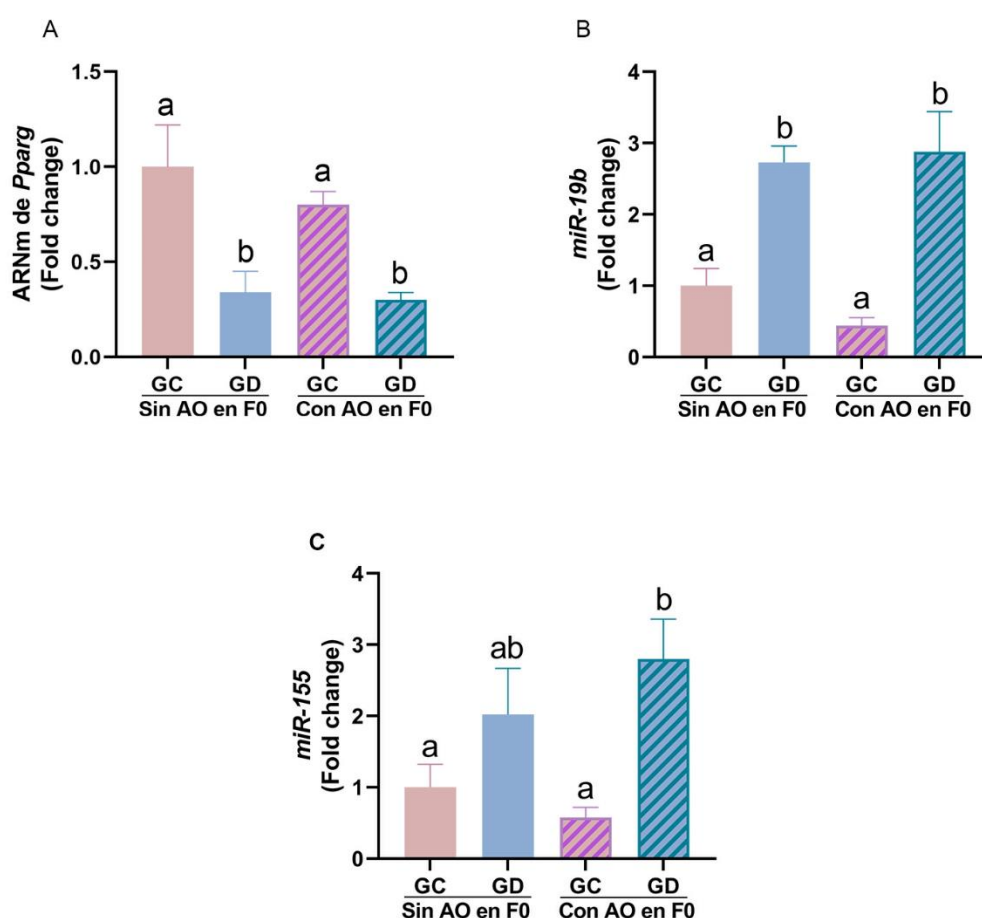


Figura 26: Niveles de ARNm de *Pparg* (A), del miR-19b (B), y del miR-155 (C) en el útero de fetos de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. $n = 6-8$. Letras distintas denotan diferencias significativas.

A continuación, evaluamos los niveles de ARNm de *Ppard* y no encontramos cambios en el útero de fetos de ratas diabéticas, que recibieron o no suplemento de aceite de oliva extra virgen en relación al control (**Figura 27A**). Al evaluar los niveles de su regulador negativo, miR-122, encontramos niveles reducidos de este microRNA en el útero de fetos de ratas diabéticas en relación al control ($p<0,01$ vs. GC) y que esta alteración persiste ante la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen (**Figura 27B**). Además, evaluamos los niveles de *Sirt1*, gen blanco de miR-122, y encontramos un aumento en sus niveles en el útero de fetos de ratas diabéticas en comparación al control ($p<0,01$ vs. GC) y que esta alteración persiste ante la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen (**Figura 27C**).

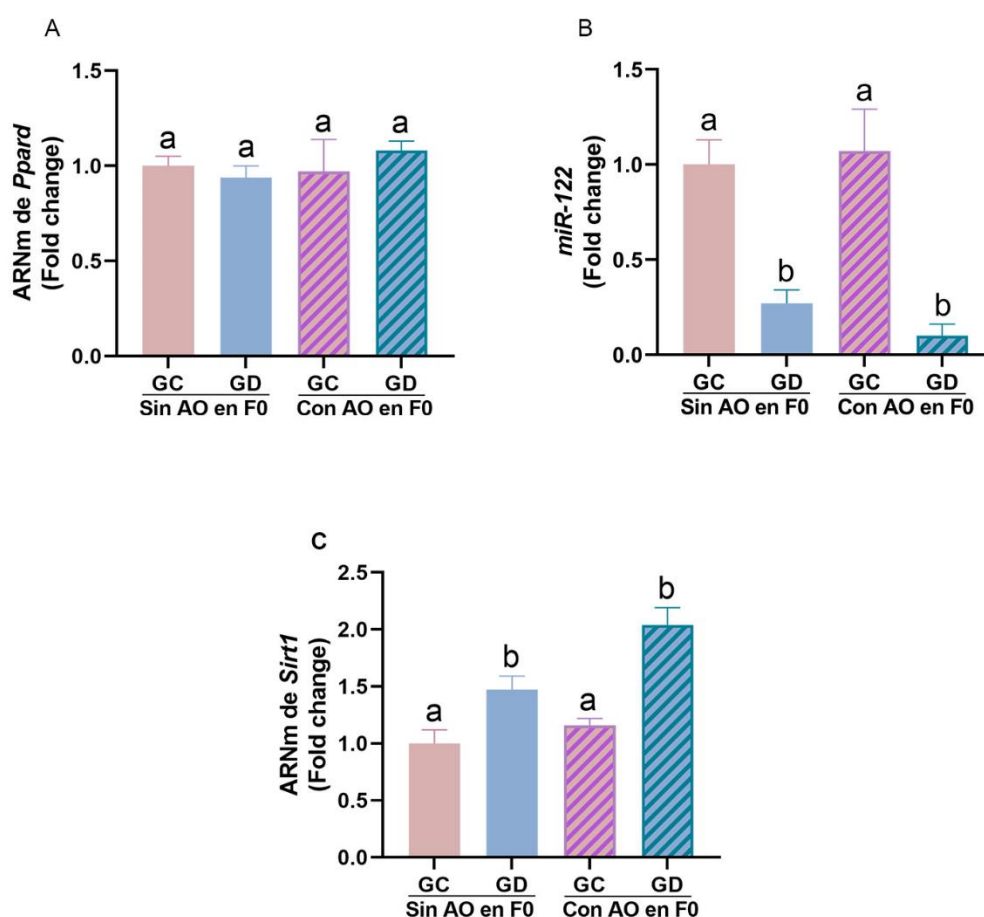


Figura 27: Niveles de ARNm de *Ppard* (A), del miR-122 (B) y de *Sirt1* (C) en el útero de fetos de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. $n=6-8$. Letras distintas denotan diferencias significativas.

3.4. Vías proinflamatorias y prooxidantes en el útero fetal

En relación al entorno proinflamatorio evaluamos los niveles de ARNm de *Mmp9* y no observamos cambios en el útero de fetos de ratas diabéticas en relación al control, tanto cuando sus madres fueron alimentadas con dieta estándar como cuando se alimentaron con dieta suplementada con aceite de oliva extra virgen en la gestación F0 (**Figura 28A**).

A continuación, evaluamos la expresión de *Cat* y *Mnsod*, dos genes que codifican proteínas antioxidantes. Encontramos que los niveles de ARNm de *Cat* no se modificaron en el útero de fetos de ratas diabéticas cuando sus madres recibieron dieta estándar en relación al control. Sin embargo, observamos un aumento significativo de los niveles de ARNm de *Cat* en el útero de fetos de ratas diabéticas ante suplemento dietario materno con aceite de oliva extra virgen en relación tanto al grupo diabético como al control que no recibieron la suplementación dietaria ($p < 0,05$ vs. GD y $p < 0,05$ vs. GC) (**Figura 28B**). De manera similar, no observamos cambios en los niveles de ARNm de *Mnsod* en el útero de fetos de ratas diabéticas en relación al control. Sin embargo, observamos un aumento en los niveles de ARNm de *Mnsod* en el útero de fetos de ratas con diabetes que recibieron la suplementación dietaria con aceite de oliva extra virgen en la gestación F0 en relación tanto al grupo diabético como al control que no recibieron la suplementación dietaria ($p < 0,05$ vs. GD y $p < 0,05$ vs. GC) (**Figura 28C**).

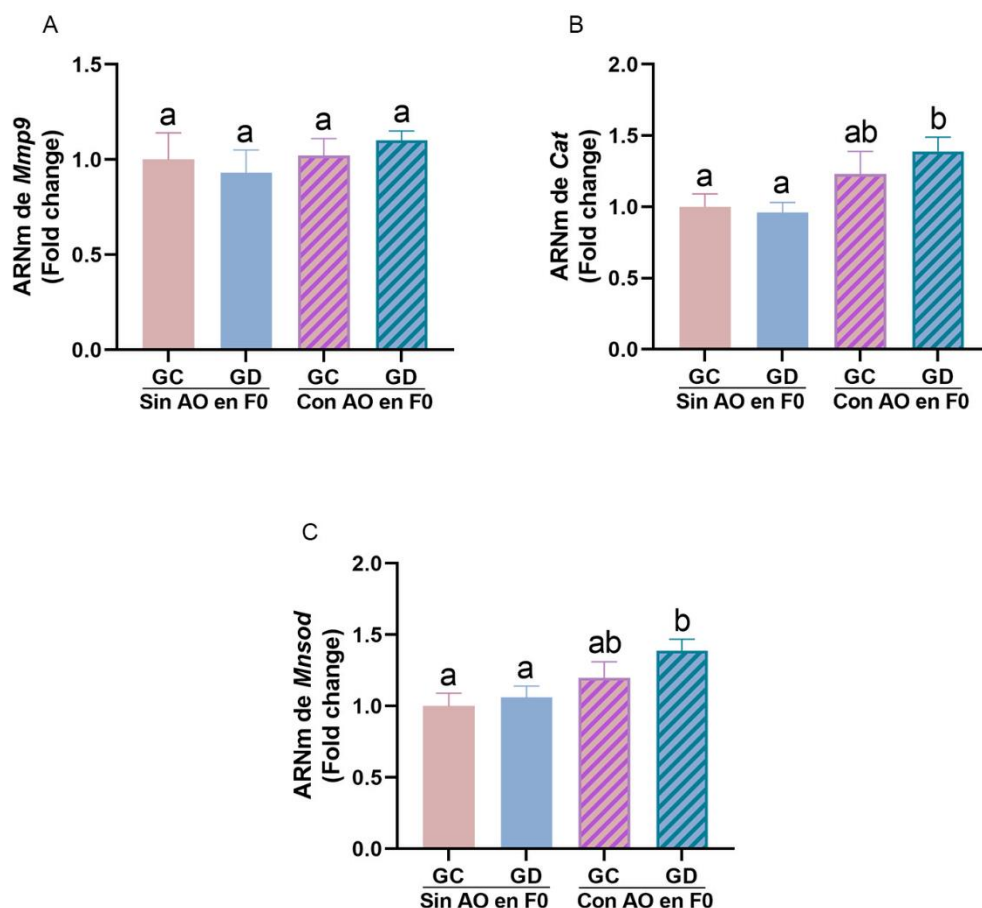


Figura 28: Niveles de ARNm de *Mmp9* (A), *Cat* (B) y *Mnsod* (C) en el útero de fetos de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. n= 6-8. Letras distintas denotan diferencias significativas.

Finalmente, evaluamos los niveles de 4-HNE, marcador del entorno prooxidante, en el útero fetal. Observamos un aumento en los niveles de 4-HNE, mayormente localizado en el estroma uterino de los fetos de ratas diabéticas en comparación con el control ($p < 0,05$ vs. GC), y que esta alteración fue prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen brindada en la gestación F0 ($p < 0,01$ vs. GD) (Figura 29).

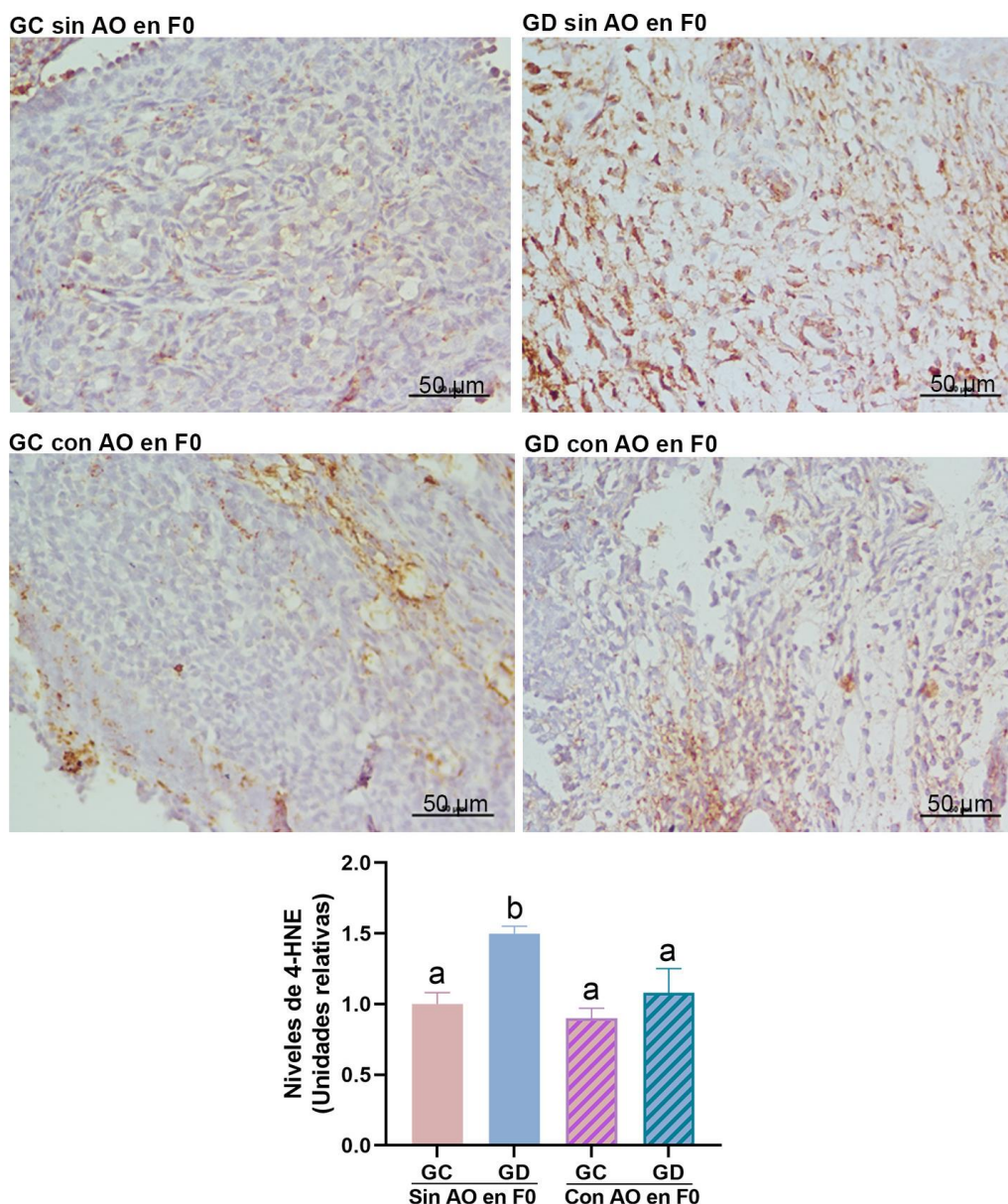


Figura 29: Inmunomarcación de 4-HNE en el útero de fetos de ratas controles (GC) y de ratas con diabetes (GD), con o sin suplemento dietario de aceite de oliva extra virgen (AO) en la gestación. Análisis estadístico: ANOVA de dos factores con post test Bonferroni. $n = 6-8$. Letras distintas denotan diferencias significativas. Aumento 400X (escala 50 μm).

Los resultados mostrados en este último capítulo evidencian que en este modelo de diabetes pregestacional (F0), el útero se encuentra alterado desde su desarrollo en etapa fetal, mostrando un posible origen de la adversa programación que se encontró al analizar a la F1 en la etapa prepuberal y en la gestación temprana. De interés, la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen pudo prevenir algunas alteraciones en proteínas relevantes en el desarrollo y función uterina, y redujo el entorno prooxidante en el útero de fetos de ratas con diabetes pregestacional.

Discusión

En el presente trabajo utilizando modelos experimentales de diabetes y preñez, se estudió en la descendencia de madres con diabetes, la programación del daño en el útero, haciendo foco en el endometrio decidualizado en etapa prepuberal, en la decidua en la gestación temprana y en el útero en etapa fetal. Se estudiaron alteraciones en marcadores de la función decidua y en las vías de señalización PPAR y mTOR y su desregulación por microRNAs. Alteraciones en estas vías, inducidas por la diabetes materna, han sido reportadas previamente por nuestro grupo de trabajo en la placenta y en distintos órganos fetales (Fornes *et al.*, 2018; Roberti *et al.*, 2018; Roberti *et al.*, 2021). En modelos experimentales de diabetes materna, el estudio de la decidua, que juega un papel fundamental en la implantación y en el desarrollo temprano del embarazo, ha sido poco estudiado. La decidua, además de ser vital para el establecimiento y el mantenimiento del embarazo, desempeña un papel esencial en el desarrollo embrionario, placentario y fetal (Ng *et al.*, 2020), lo que subraya la relevancia de estudiar cómo las alteraciones en este tejido podrían influir en la salud a largo plazo de la descendencia.

En este contexto, estudiamos el efecto de una dieta materna enriquecida en aceite de oliva extra virgen brindada durante la gestación. Nuestros estudios previos han demostrado que las dietas maternas enriquecidas en aceite de oliva extra virgen reducen el daño inducido en la placenta y en diversos órganos fetales afectados por la diabetes experimental (Higa *et al.*, 2014; Kurtz *et al.*, 2014b; Fornes *et al.*, 2020). En pacientes con diabetes gestacional, se ha demostrado que las dietas enriquecidas en aceite de oliva extra virgen reducen múltiples alteraciones proinflamatorias y metabólicas en el suero materno y en la placenta (Gomez Ribot *et al.*, 2020; Gomez Ribot *et al.*, 2023). El aceite de oliva extra virgen es un agente nutrigenómico que ha demostrado efectos benéficos en enfermedades cardiovasculares y metabólicas (Guasch-Ferre *et al.*, 2014; Wongwarawipat *et al.*, 2018). Los efectos del aceite de oliva extra virgen se atribuyen principalmente a su capacidad antioxidante y antiinflamatoria, ejercida por varios de sus componentes. Entre ellos los polifenoles, que poseen potentes propiedades antioxidantes, y su principal componente, el ácido oleico, un ácido graso monoinsaturado que puede activar los receptores nucleares PPAR, reguladores clave del entorno prooxidante y proinflamatorio (Piroddi *et al.*, 2017; Santa-Maria *et al.*, 2023).

Nuestros resultados muestran que la mayoría de las alteraciones observadas en el útero y en la decidua de la descendencia de rata diabética se previnieron con dietas maternas enriquecidas en aceite de oliva extra virgen, lo que indica la capacidad de este suplemento dietario como tratamiento potencial para reducir, al menos en parte, la programación de anomalías reproductivas en la descendencia hembra.

En este estudio, las madres con diabetes pregestacional presentaron características metabólicas semejantes a las observadas en investigaciones previas (Jawerbaum y White 2010; Martinez *et al.*, 2012; White *et al.*, 2015). La descendencia en etapa prepuberal, mostró niveles de glucosa en sangre dentro del rango normal, lo cual también ha sido reportado previamente (Higa *et al.*, 2017). La programación de la diabetes gestacional en estas crías hembras se evidencia cuando a los tres meses de edad, se aparean con machos control (Capobianco *et al.*, 2016), mientras que la programación de DMT2 ocurre cuando las crías alcanzan los 5 meses de edad (Capobianco *et al.*, 2015).

Comenzando este estudio, nos centramos en la evaluación de las crías prepúberes de ratas diabéticas, a fin de identificar posibles alteraciones presentes en el útero previo a la edad reproductiva, que podrían afectar la gestación temprana en ratas propensas a desarrollar diabetes gestacional.

En nuestro trabajo, utilizamos un método hormonal clásico para inducir la decidualización (Qi *et al.*, 2018), y evidenciamos que en las crías de ratas diabéticas, la histología, el peso uterino y los niveles de progesterona fueron semejantes al control. Sin embargo, los úteros decidualizados de las crías de ratas diabéticas presentaron niveles reducidos de prolactina y su receptor. Esto indica alteraciones en una vía hormonal clave para la decidualización, la implantación, y el desarrollo tanto embrionario como placentario (Burton y Jauniaux 2023). Teniendo en cuenta estos resultados, es importante señalar que una dieta materna rica en aceite de oliva extra virgen puede proteger, al menos en parte, en el modelo de diabetes materna estudiado, a los úteros decidualizados de la descendencia de las alteraciones en la vía de señalización de la prolactina. Estos resultados son relevantes al considerar que cuando la decidualización en ratones o ratas se comparan con los humanos, a pesar de varias

diferencias en las proteínas y genes expresados en respuesta a la decidualización, hay similitudes en el papel de muchos transcritos, proteínas y hormonas (como la prolactina, un marcador principal de decidualización), así como en diversas vías de señalización, incluidas las vías de mTOR y de los PPAR (Wieser *et al.*, 2008; Liu y Wang 2015; Zhang *et al.*, 2016).

IGFBP1 tiene un papel fundamental en la decidualización y es un conocido marcador de la función decidual (Abrahamsohn y Zorn 1993; Mikhailov 2003). En el proceso de decidualización, la unión de IGFBP1 al factor de crecimiento IGF1 promueve la diferenciación de las células deciduales, priorizando este proceso frente al crecimiento celular. Nuestros resultados muestran que los niveles de ARNm de *Igfbp1* están aumentados en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas diabéticas, sin observarse cambios frente a la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen. Este incremento podría implicar una menor biodisponibilidad y desbalance en los niveles de factores de crecimiento clave para la decidualización y el desarrollo como lo son IGF1 e IGF2 (Fowler *et al.*, 2000).

Además, encontramos un aumento en los niveles de ARNm de *Grb10* en el útero decidualizado de crías prepúberes de ratas diabéticas, que podría vincularse con alteraciones en la señalización celular y la proliferación en el tejido endometrial ya que estos son procesos regulados por GRB10 durante la implantación y la decidualización (Xia *et al.*, 2014). Cabe destacar que la alterada expresión génica de GRB10 fue prevenida por el suplemento de aceite de oliva extra virgen, lo que sugiere un posible efecto protector de este compuesto sobre la decidualización uterina.

Dado que la diabetes materna se ha asociado con alteraciones en la expresión de diversos factores de crecimiento y mediadores moleculares involucrados en la remodelación endometrial (Zhai *et al.*, 2022), nuestros estudios evidencian que parte de estas alteraciones podrían también estar presente en la cría prepúber de ratas diabéticas.

Por otro lado, FABP4 es una proteína relevante tanto para el transporte de lípidos como para el proceso de decidualización, en parte mediado a través de la regulación de procesos angiogénicos y de proliferación celular (Storch y Thumser 2010; Wang *et al.*,

2017). Esta proteína se encuentra regulada positivamente tanto por los PPAR como por mTOR (Tan *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2017). Nuestros resultados mostraron que los niveles de ARNm de *Fabp4*, así como de su proteína, están aumentados en el útero decidualizado de ratas prepúberes descendientes de ratas diabéticas. Estos hallazgos refuerzan la evidencia sobre la influencia de la diabetes materna en la alteración de la función decidual en sus crías hembras. De interés, la administración de dietas maternas enriquecidas con aceite de oliva extra virgen previno el aumento en los niveles de FABP4, hallazgo que toma relevancia dado el vínculo entre los elevados niveles de FABP4 y diversas patologías metabólicas (Basarir Sivri y Ciftci 2024).

Por otro lado, en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, se encontraron niveles elevados de la proteína PLIN2 en las glándulas uterinas de ratas diabéticas en etapa de postimplantación temprana, siendo esta proteína importante en el proceso de decidualización y en la nutrición histotrófica (Roberti *et al.*, 2018). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron cambios en los niveles de PLIN2 en el útero decidualizado de la cría prepúber de ratas diabéticas. Tampoco hubo cambios en los niveles de ARN mensajero de *Vegf* en el útero decidualizado de la cría prepúber de ratas diabéticas, considerándose que futuros estudios deberán indagar en forma más profunda si existen alteraciones en procesos angiogénicos vinculados a la adversa programación del proceso de decidualización en la descendencia de rata diabética.

En comparación con la extensa investigación sobre los PPAR en la placenta, los estudios sobre la expresión y la función de los PPAR en el útero antes del establecimiento de la placenta son escasos. Los tres isotipos de los PPAR se expresan en el útero de la rata durante la gestación temprana y cumplen funciones importantes durante la implantación o decidualización (Nishimura *et al.*, 2011). PPAR α es esencial en etapas muy tempranas de la decidualización del estroma, desempeñando funciones importantes en la diferenciación de las células estromales en células deciduales (Nishimura *et al.*, 2011).

En estudios previos de nuestro laboratorio encontramos niveles reducidos de PPAR α en la decidua de ratas con diabetes pregestacional en período de postimplantación temprana (Higa y Jawerbaum 2013; Roberti *et al.*, 2023) mientras que en la placenta de ratas con diabetes pregestacional, evidenciamos en período de post-

placentación niveles elevados PPAR α (Martinez *et al.*, 2008), a diferencia de lo que ocurre a término, donde se evidencian menores niveles placentarios de este receptor nuclear (Martinez *et al.*, 2011). Esto denota la susceptibilidad a cambios en los niveles de PPAR α inducido por la diabetes materna en forma dependientes del tejido y la etapa gestacional. En este trabajo, en los úteros decidualizados de las crías prepúberes de ratas diabéticas encontramos un aumento en los niveles del ARNm de PPAR α , sin evidenciar cambios en los niveles proteicos de PPAR α . Las diferencias entre la expresión génica y niveles proteicos de PPAR α encontrados, podrían atribuirse a una regulación postraducciona por ubiquitinación (Blanquart *et al.*, 2002). En efecto, en el hígado se encontró que la ubiquitinación condujo a la degradación de la proteína PPAR α incluso cuando su expresión génica está aumentada, un mecanismo regulado por SIRT1 (Suh *et al.*, 2022). En este estudio, encontramos un aumento en los niveles de ARNm de *Sirt1* en los úteros decidualizados de crías de ratas diabéticas, lo que sugiere una vía similar que regula los niveles de PPAR α en los úteros decidualizados, aunque se necesitan más investigaciones para aclarar este punto.

Por otro lado, la expresión génica de PPAR α está regulada negativamente por miR-22 y miR-21 en diferentes tejidos (Kida *et al.*, 2011; Gurha *et al.*, 2013; Chuppa *et al.*, 2018), microRNAs que están implicados en el proceso de decidualización (Ma *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2019). En este trabajo, los niveles de miR-22 se mantuvieron sin cambios en los úteros decidualizados de las crías de ratas diabéticas. Por el contrario, los niveles de miR-21 estaban muy reducidos en este tejido, y por lo tanto, posiblemente implicados en los aumentos observados en los niveles de ARNm de *Ppara*, alteraciones que se previnieron con la dieta materna enriquecida en aceite de oliva extra virgen brindada durante la gestación F0. Dado que en forma previa, en la decidua de ratas diabéticas pregestacionales en etapa de postimplantación, se evidenció que los niveles de miR-21 también se encuentran disminuidos (Roberti *et al.*, 2023), nos permitimos sugerir que miR-21 es un microRNA vinculado a los alterados procesos de decidualización tanto en las madres diabéticas como en las crías hembras, y serán de interés futuros estudios que expliquen los mecanismos de regulación epigenética implicados en la observada transmisión intergeneracional.

En estudios previos, hemos evidenciado aumentos de los niveles de PPAR γ en la decidua de ratas diabéticas durante la etapa de gestación temprana (Roberti *et al.*, 2023), modelo experimental de diabetes pregestacional que da origen a la F1 en estudio, donde observamos efectos similares. En efecto, los úteros decidualizados de las crías prepúber de ratas diabéticas mostraron aumentos de los niveles de PPAR γ y de ARNm de *Pparg*, gen que se encuentra regulado negativamente por miR-19b y miR-155 en diferentes tejidos (Tryggestad *et al.*, 2019; Juiz-Valina *et al.*, 2022). En este estudio, observamos que la diabetes materna indujo la programación de niveles reducidos de miR-19b y miR-155 en los úteros decidualizados de sus crías prepúber, alteración posiblemente vinculada con la elevada expresión y niveles de PPAR γ evidenciada en este estudio. Observamos también, que la dieta enriquecida en aceite de oliva extra virgen no fue capaz de modificar la expresión ni de estos microRNAs reguladores de PPAR γ , ni de los niveles de este factor de transcripción nuclear. Estos resultados muestran la programación de una vía PPAR γ decidual alterada en la cría prepúber de rata diabética, alteración semejante a la previamente evidenciada en la decidua de ratas con diabetes pregestacional en gestación temprana de la F0, modelo experimental que da origen por programación intrauterina a las ratas en estudio en este trabajo de tesis (Roberti *et al.*, 2023).

Por otro lado, en este estudio, y al igual que lo observado previamente en el útero de ratas con diabetes pregestacional (Roberti *et al.*, 2023), no se observaron cambios en los niveles de expresión génica y proteica de PPAR δ en el útero decidualizado de las crías prepúberes de ratas diabéticas. Sin embargo, los cambios observados en los niveles de miR-122, regulador negativo de PPAR δ en otros tejidos (Fornes *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2023), sugieren que este microRNA desempeña un papel regulador diferente en los tejidos deciduales. Un blanco relevante de miR-122 es SIRT1, una histona desacetilasa dependiente de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) que desempeña un papel crucial en la regulación metabólica (Boutant y Canto 2014) y está implicada en la decidualización (Ochiai *et al.*, 2019). De hecho, se ha implicado una alteración de la vía miR-122-SIRT1 en la patogénesis de enfermedades metabólicas e inflamatorias (Long *et al.*, 2019). Los niveles aumentados observados en la expresión del gen *Sirt1* en los úteros decidualizados de las crías de ratas diabéticas evidenciados cuando se reduce miR-122,

y la capacidad de la dieta materna enriquecida en aceite de oliva extra virgen para prevenir estas alteraciones, sugieren que esta dieta puede prevenir alteraciones en una vía relevante en la regulación metabólica en la decidua de las crías de ratas diabéticas, vía que será relevante profundizar en futuros estudios.

Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado un entorno proinflamatorio intrauterino en modelos de diabetes pregestacional, y su vinculación con alterados procesos de remodelación de la matriz extracelular (Pustovrh *et al.*, 2007; Higa *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2012). Al evaluar la expresión del ARN mensajero de TNF α , citocina relevante en los procesos de inflamación (Bradley *et al.*, 2008), observamos un incremento en la expresión génica de dicha citocina en el útero decidualizado de las crías prepúberes de ratas diabéticas. Además, encontramos niveles proteicos aumentados de la MMP9, metaloproteasa que se encuentra incrementada cuando hay una activa remodelación de la matriz extracelular, conociéndose que sus niveles elevados son un clásico marcador de un entorno proinflamatorio (Manicone y McGuire 2008). Nuestros resultados sugieren que la diabetes materna programa un entorno proinflamatorio en el útero decidualizado de sus crías en la etapa prepuberal y su prevención mediada por una dieta materna enriquecida en aceite de oliva extra virgen.

Diversos estudios han demostrado que la diabetes materna induce un entorno prooxidante a nivel intrauterino, como así también que programa un entorno prooxidante en el hígado y corazón de su descendencia (Higa *et al.*, 2017; Fornes *et al.*, 2020; Roberti *et al.*, 2020).

En el presente estudio, como marcador de estrés oxidativo, evaluamos los niveles de 4-HNE, marcador de lipoperoxidación, cuya acumulación se relaciona con disfunción celular y daño tisular en condiciones patológicas (Dham *et al.*, 2021). Nuestros resultados indican que el estroma decidualizado de crías prepúber de ratas diabéticas presenta niveles elevados de 4-HNE, lo que sugiere un entorno prooxidante en este tejido. Sin embargo, observamos que la suplementación con aceite de oliva en la dieta materna fue capaz de prevenir esta alteración, lo que resalta la capacidad de esta

suplementación dietaria materna en la regulación del estrés oxidativo en la decidua de sus crías.

Además, evaluamos la expresión de dos genes clave que codifican proteínas antioxidantes, *Cat* y *Mnsod*. Los resultados mostraron un incremento en los niveles de ARNm de ambos genes en el útero decidualizado de ratas diabéticas en comparación con los controles. Este hallazgo podría ser una respuesta compensatoria ante el incremento de estrés oxidativo observado, tal como se evidenció previamente en fetos de ratas con diabetes pregestacional (Pustovrh *et al.*, 2005).

Avalando esta hipótesis, observamos que cuando el estrés oxidativo se reduce por efecto de la suplementación materna con aceite de oliva extra virgen, la expresión de ARNm de *Cat* y *Mnsod* se normaliza en el útero decidualizado de la cría prepúber de rata diabética.

Por otro lado, se conoce que la vía de mTOR es relevante en el proceso de decidualización (Roberti *et al.*, 2018; Gupta y Jansson 2019) y que miR-21, cuyos niveles encontramos alterados en el útero decidualizado de la cría prepúber de rata diabética, regula de manera negativa clásicos inhibidores de la vía mTOR, como PTEN y FOXO1 (Song *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2021). Estos antecedentes y hallazgos previos nos llevaron a evaluar esta vía de señalización intracelular. Nuestros resultados evidencian que el útero decidualizado de la cría prepúber de rata diabética no presenta anomalías en la expresión génica de mTOR, pero que reguladores de la actividad de su vía de señalización están alterados. En efecto, se evidencia en estos tejidos un aumento en los niveles de ARNm de *Pten* y *Foxo1*, que son reguladores negativos de la vía mTORC1 (Chen *et al.*, 2010; Eijkelenboom y Burgering 2013), así como de *Pink*, un gen diana de FOXO1 implicado en la función mitocondrial y que se expresa en respuesta a un incremento en el estrés oxidativo (Eijkelenboom y Burgering 2013; Li *et al.*, 2017). De interés, estos aumentos se previenen cuando la madre recibió una dieta enriquecida con aceite de oliva extra virgen durante su gestación.

El análisis de la actividad de la cascada de fosforilación de mTORC1 (Laplanche y Sabatini 2013; Gupta y Jansson 2019), evaluada mediante el estudio de la fosforilación de proteínas aguas abajo de la vía mTORC1 muestra que la actividad de la vía mTORC1

se encuentra alterada en los úteros decidualizados de las crías prepúber de ratas diabéticas, tal como lo reflejan los reducidos niveles de la proteína ribosomal S6 fosforilada/total y de la proteína 4E-BP1 fosforilada/total. Estos hallazgos demuestran la programación fetal de alteraciones en una vía relevante para la decidualización y la función decidual en la cría prepúber de ratas con diabetes pregestacional, cobrando relevancia el hallazgo de que estas alteraciones fueron prevenidas mediante la dieta materna enriquecida en aceite de oliva extra virgen.

Los hallazgos evidenciados al estudiar la etapa prepuberal en la descendencia de ratas diabéticas nos permitieron identificar la programación fetal de alteraciones en el proceso de decidualización y función decidual en una etapa prepuberal. Además, pudimos evidenciar cómo dietas maternas enriquecidas en aceite de oliva extra virgen previene una gran parte de las alteraciones evidenciadas. Por ello, consideramos relevante continuar evaluando el tejido decidual de la F1 durante el proceso fisiológico de la decidualización en la preñez, analizando el día 9 de preñez, etapa correspondiente al período de postimplantación temprana. En esta etapa gestacional la función decidual cobra una función indispensable para el apropiado desarrollo del embrión y de la placenta, necesario para conducir a una adecuada función placentaria y desarrollo fetal (Mori *et al.*, 2016; Ng *et al.*, 2020). En este crítico período de la gestación temprana, la función histotrófica de la decidua actúa en coordinación con estructuras tales como el saco vitelino y las glándulas uterinas permitiendo el suministro de nutrientes al embrión y la placenta en desarrollo (Carter y Enders 2016; Kelleher *et al.*, 2018). La adecuada función decidual será clave para el normal desarrollo y función de la placenta, y para el normal desarrollo y crecimiento del feto.

En este estudio, al evaluar a ratas de la F1 en el día 9 de gestación, descendientes de ratas sanas y diabéticas, observamos que las ratas presentaron normoglucemia en la etapa de gestación temprana. Este resultado era esperado ya que como se demostró previamente, la descendencia de ratas con diabetes pregestacional desarrolla diabetes gestacional por programación intrauterina en la gestación a término (Capobianco *et al.*, 2016). Tampoco encontramos cambios en el número de embriones implantados ni en la tasa de reabsorciones embrionarias en el día 9 de gestación en la descendencia de ratas con diabetes. Este resultado también era esperado ya que en la gestación a término de

la descendencia de ratas con diabetes pregestacional, que desarrolla diabetes gestacional, no presenta cambios en el número de fetos implantados, si bien dichos fetos presentan diversas alteraciones metabólicas y vinculadas al entorno prooxidante y proinflamatorio (Fornes *et al.*, 2018; Fornes *et al.*, 2020; Roberti *et al.*, 2020; Taqui *et al.*, 2020).

En el día 9 de preñez, las ratas descendientes de madres diabéticas presentaron niveles normales de progesterona, hormona que regula la expresión de prolactina a nivel decidual (Lohmiller y Sonya 2006). Sin embargo, encontramos niveles reducidos de ARNm de prolactina y del receptor de prolactina en la decidua en el día 9 de gestación de ratas descendientes de madres diabéticas, mostrando alteraciones en esta vía clave para la correcta decidualización (Dai *et al.*, 2000), hallazgo similar a la desregulación de esta vía evidenciada al estudiar a la descendencia de rata diabética en etapa prepuberal. A diferencia de lo observado previamente en la etapa prepuberal, no evidenciamos efecto benéfico de la dieta materna enriquecida en aceite de oliva extra virgen sobre la expresión del gen de prolactina y del receptor de prolactina. Dada la complejidad de los eventos involucrados en la preñez temprana, donde la interacción entre células deciduales, las células inmunes, y la relevante la interacción trofoblasto-decidua (Ramhorst *et al.*, 2022), podrían condicionar la respuesta a los tratamientos maternos, será interesante abordar en futuros estudios la posible influencia de las células inmunes y trofoblásticas en la menor respuesta regulatoria observada en la vía de prolactina en la decidua cuando se evalúa el efecto de la dieta materna enriquecida en aceite de oliva extra virgen en el día 9 de preñez de la descendencia de rata diabética.

En forma similar a lo observado al estudiar la descendencia prepuberal de ratas diabéticas, en el día 9 de preñez encontramos un incremento en los niveles de FABP4 en la decidua de ratas descendientes de madres diabéticas, alteración que indicaría fallas en la función decidual en esta etapa crítica de gestación temprana, considerando su importante función en la decidua, y conociéndose el vínculo entre el incremento de FABP4 en diferentes tejidos y patologías metabólicas, incluyendo la diabetes gestacional (Roberti *et al.*, 2021; Ruzsala *et al.*, 2022; Basarir Sivri y Ciftci 2024). Cabe destacar la capacidad de la dieta materna enriquecida en aceite de oliva extra virgen en prevenir

los anómalos niveles de este marcador de anomalía metabólica y función decidual tanto en la etapa de gestación temprana como en la etapa prepuberal.

En la decidua y durante el desarrollo placentario los tres isotipos de PPAR desempeñan un papel relevante involucrados en la decidualización, la implantación y la formación de la placenta (Jawerbaum y Capobianco 2011; Roberti *et al.*, 2018). Al analizar la decidua en el día 9 de preñez, nuestros resultados mostraron una disminución en los niveles proteicos de PPAR α en la decidua de la descendencia de ratas diabéticas en comparación con el grupo control, lo cual estuvo asociado con un aumento en los niveles de miR-21, un regulador negativo del gen *Ppara* (Chuppa *et al.*, 2018), involucrado en la implantación y etapa temprana de la gestación (Abbott 2009). Es de interés que los cambios en PPAR α inducidos por la diabetes materna en la decidua de su descendencia en etapa prepuberal y de gestación temprana, claramente se reflejen en los cambios en los niveles de miR-21, sugiriendo una importante función de este microRNA en la regulación negativa de los niveles de PPAR α , isoforma clave en los procesos de regulación metabólica en la decidua y la placenta (Jawerbaum y Capobianco 2011; Roberti *et al.*, 2018).

Al estudiar la vía de PPAR γ , observamos una reducción en los niveles proteicos de PPAR γ en la decidua de ratas diabéticas en el día 9 de gestación en comparación con los controles. Esta disminución estuvo acompañada por un aumento en la expresión de miR-19b, previamente identificado como un regulador negativo de PPAR γ (Juiz-Valina *et al.*, 2022) no solo en diferentes tejidos sino también en la decidua. En efecto, se ha demostrado que la sobreexpresión de miR-19b puede inhibir la traducción de PPAR γ , afectando procesos fisiológicos clave como la diferenciación decidual y la modulación del ambiente inflamatorio (Juiz-Valina *et al.*, 2022). Dado que PPAR γ tiene un papel antiinflamatorio y promueve la homeostasis del tejido uterino durante la implantación, la observada reducción podría contribuir a un proceso decidual alterado programado por la diabetes materna. Trabajos previos han mostrado que la diabetes pregestacional experimental induce una reducción de los niveles de PPAR γ en la placenta a término, mientras que a mediados de la gestación, se observa un incremento en sus niveles placentarios (Pustovrh *et al.*, 2009; Capobianco *et al.*, 2018a). En este estudio, las diferentes alteraciones evidenciadas en los niveles deciduales de este receptor nuclear

en la etapa prepuberal y la gestación temprana, se acompañan de cambios en la expresión de microRNAs que los regulan negativamente, sugiriendo nuevamente la relevancia de los microRNAs como factores clave en la regulación de la vía de los PPAR.

En cuanto a PPAR δ , es de interés el hallazgo de sus niveles reducidos en la decidua de las crías de ratas diabéticas en la gestación temprana, dada la relevancia de este receptor nuclear en procesos de diferenciación de células deciduales e implantación (Wang *et al.*, 2007a; Roberti *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2020). Estudios previos realizados en modelos de diabetes pregestacional, no muestran cambios en la expresión decidual de PPAR δ (Higa *et al.*, 2014; Roberti *et al.*, 2023), por lo cual surge el interés de comprender los mecanismos implicados en la programación fetal de alteraciones en los niveles de este receptor nuclear. PPAR δ está regulado negativamente por el miR-122 (Fornes *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2023), cuyo nivel también se incrementó en la decidua de día 9 de gestación en las ratas descendientes de madres diabéticas, en comparación con el grupo control. La importancia de miR-122 como microRNA marcador de patologías metabólicas y cardiovasculares (Jafri 2023; Colaianni *et al.*, 2024), junto a los hallazgos vinculados a los menores niveles de PPAR δ , relevante en los procesos de decidualización y gestación temprana (Nishimura *et al.*, 2011), sugieren que las anomalías evidenciadas en la vía miR-122-PPAR δ podrían ser importantes en el contexto de la programación fetal de anomalías deciduales inducidas por la diabetes materna.

Al analizar el efecto de la dieta materna enriquecida en aceite de oliva extra virgen en los niveles de los PPAR y microRNAs que los regulan en la decidua de la descendencia de rata diabética en el día 9 de preñez, observamos que esta dieta ejerce menos efectos protectores, de lo que habíamos evidenciado en la etapa prepuberal. Esta falta de acción es diferente a la que previamente se evidenció en la descendencia de ratas diabéticas cuando se estudió a término la placenta y diferentes órganos fetales (Capobianco *et al.*, 2015; Roberti *et al.*, 2020; Taqui *et al.*, 2020), sugiriendo nuevamente una particular interacción de los trofoblastos y células inmunes deciduales en esta etapa temprana donde cada vez hay más evidencias de la influencia de los mismos (Meng *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2024).

Existiendo un importante vínculo entre las anomalías en la actividad de los PPAR y el entorno prooxidante y proinflamatorio (Lappas *et al.*, 2011; Wahli y Michalik 2012),

evaluamos en el día 9 de preñez marcadores del entorno prooxidante y proinflamatorio en la decidua de ratas descendientes de ratas diabéticas. Nuestros resultados mostraron niveles incrementados de 4-HNE, marcador del entorno prooxidante, en la decidua de ratas de día 9 de preñez descendientes de madres diabéticas, alteración semejante a la evidenciada previamente en la etapa prepuberal. Cabe destacar que la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen pudo prevenir dicha alteración, mostrando que el efecto antioxidante de esta suplementación materna dietaria persiste en la gestación temprana en la decidua de la progenie. Este efecto benéfico también se evidenció previamente al estudiar al corazón de la descendencia en su etapa adulta (Roberti *et al.*, 2020). Con respecto a los genes antioxidantes, *Cat* y *Mnsod*, no se vieron modificados en la decidua de ratas de día 9 de preñez, descendientes de madres diabéticas, pero sí hubo un incremento significativo de *Cat* en la decidua de ratas descendientes de madres que recibieron el suplemento de aceite de oliva extra virgen, que posiblemente sume a la reducción del entorno prooxidante evidenciado. Los cambios evidenciados en la expresión decidual de *Cat* y *Mnsod* son diferentes a los que observamos previamente en la etapa prepuberal ante la diabetes materna y ante el suplemento materno con aceite de oliva extra virgen, sugiriendo nuevamente, la importancia de la influencia del entorno trofoblástico en la respuesta a cambios programados por la diabetes materna.

IL-1 β es una citocina proinflamatoria miembro de la familia de la interleuquina 1. Es sintetizada en forma de pro-IL-1 β y clivada por caspasa-1 tras el ensamble y activación del inflamasoma NLRP3 para dar lugar a su forma activa, potente mediador inflamatorio involucrado en la apoptosis celular (Wang *et al.*, 2023). Si bien en la etapa prepuberal evaluamos y encontramos incrementados los niveles de otros marcadores del entorno proinflamatorio, al estudiar en esta etapa temprana de la gestación, no encontramos cambios en los niveles de *Il-1b* en la decidua de la descendencia de rata diabética, requiriéndose continuar en futuros estudios con la evaluación de otros marcadores proinflamatorios.

Al evaluar la actividad de la vía de mTOR, mediante el estudio de la fosforilación de proteínas aguas abajo de la vía mTORC1, nuestros resultados mostraron una reducida actividad de la vía mTORC1 en la decidua de ratas de 9 días de preñez descendientes de

ratas diabéticas, tal como había sido evidenciado al estudiar la decidua en la etapa prepuberal. En efecto, se evidencian reducidos niveles de la proteína ribosomal S6 fosforilada/total en la decidua de crías de ratas diabéticas mostrando menor actividad de mTORC1, mientras que los niveles de 4E-BP1 en sus formas fosforiladas y total se reducen, mostrando alteraciones que llevarían a la reducción de la síntesis proteica. Estos hallazgos demuestran la programación fetal de alteraciones en vías de señalización celular relevantes para la deciduización y la función decidual (Gupta y Jansson 2019). Cabe destacar que estas alteraciones no fueron prevenidas mediante la dieta materna enriquecida en aceite de oliva extra virgen en la etapa de gestación temprana, a diferencia de lo que ocurre en la etapa prepuberal, donde las mismas se previenen, resultados que nuevamente señalan posibles acciones vinculadas a la interacción entre el trofoblasto, las células inmunes deciduales y la regulación de las vías de señalización implicadas en la deciduización (Meng *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2024). Es de interés destacar, que estudios previos han mostrado la capacidad de dietas enriquecidas en aceite de oliva en prevenir anomalías en la vía de mTOR en la placenta a término en la descendencia de ratas con diabetes que desarrollan diabetes gestacional (Capobianco *et al.*, 2018b).

Los hallazgos evidenciados al estudiar la etapa de gestación temprana en la descendencia de ratas diabéticas nos permitieron identificar la programación fetal de alteraciones en hormonas y factores proteicos, vías de señalización intracelular de los PPAR y mTOR y un entorno prooxidante, que posiblemente darían lugar a alteraciones placentarias y fetales, como aquellas que fueron previamente evidenciadas al evaluar a término a estos animales (Capobianco *et al.*, 2018a; Fornes *et al.*, 2018). En forma novedosa, nos hacen reflexionar acerca de las alteraciones presentes en la decidua en un modelo que presenta normoglucemia en la gestación temprana, y por lo tanto es principalmente su historia familiar, aquella que nos marca que tendrá riesgo de diabetes gestacional y alteraciones feto-placentarias, quizás condicionadas, al menos en parte, por esta alterada función decidual. Cada vez más estudios consideran la importancia del período de gestación temprana y su vinculación con alteraciones tanto en el desarrollo feto-placentario como en la programación fetal (Hivert *et al.*, 2024).

El concepto de programación fetal, más conocido por sus siglas en inglés DOHAD (*developmental origin of health and disease*) hoy en día abarca tanto la gestación como la lactancia y los primeros 1000 días del nacido (Holme y Sitras 2020), considerándose estos los períodos donde se pueden producir cambios relevantes que condicionen la salud y la enfermedad en el adulto. En este contexto, en nuestros estudios en modelos experimentales de diabetes y preñez, identificamos a la gestación como un período clave en el desarrollo de alteraciones fetales, donde los fetos están expuestos tanto a la hiperglucemia materna, como al entorno prooxidante y proinflamatorio intrauterino inducido por esta patología (Lappas *et al.*, 2011). Si bien nuestros estudios previos estudiaron el impacto de la diabetes materna en diferentes órganos fetales como el corazón, el hígado y el pulmón (Martinez *et al.*, 2011; Kurtz *et al.*, 2012; Kurtz *et al.*, 2014b), poco se conoce de las alteraciones presentes en el útero de los fetos hembra, alteraciones que podrían programar las anomalías deciduales que evidenciamos en la descendencia. Por ello, en este trabajo, nos propusimos evaluar al útero de fetos de rata diabética en la gestación a término. Además, como la dieta materna enriquecida en aceite de oliva extra virgen fue capaz de prevenir parte de las alteraciones evidenciadas en el útero de la descendencia en etapa prepuberal y gestacional, analizamos el efecto de esta dieta materna en el útero fetal de ratas diabéticas y sus respectivos controles.

Al evaluar a los fetos de ratas diabéticas de 21 días de gestación, nuestros resultados mostraron hiperglucemia fetal, tanto hembras como machos, y que la dieta materna enriquecida en aceite de oliva extra virgen no previno la hiperglucemia, resultados similares a los observados previamente en otros trabajos de nuestro laboratorio (Fornes *et al.*, 2018).

En el útero de fetos de ratas diabéticas, nuestros resultados muestran niveles reducidos de ARNm de prolactina, hormona relevante para el desarrollo de diferentes órganos fetales (Freemark *et al.*, 1995; Fourcade *et al.*, 2013; Yarlagadda *et al.*, 2019). Además, nuestros resultados mostraron que los niveles de ARNm del receptor de prolactina en el útero de fetos de ratas diabéticas se encuentran reducidos. Dado que nuestros resultados en la F1 evidenciaron en el útero decidualizado y en la decidia durante la preñez, reducidos niveles de prolactina y su receptor, nos permitimos sugerir que la alteración en la señalización de esta hormona en el útero ocurre desde la etapa

fetal. De interés, la suplementación materna con aceite de oliva extra virgen logró prevenir, en parte, las alteraciones en los niveles de prolactina y la expresión génica de su receptor en el útero fetal de ratas diabéticas, resultado consistente con la prevención de dichas anomalías en la descendencia prepúber. Sin embargo, esta regulación a nivel fetal no fue suficiente para prevenir las alteraciones evidentes en la gestación temprana de la descendencia. La complejidad de las funciones deciduales en la gestación temprana, y las múltiples interacciones materno-trofoblásticas que implican el período de postimplantación y placentación (Higa *et al.*, 2014; Roberti *et al.*, 2023) se postula están involucradas en la menor respuesta de la dieta enriquecida en aceite de oliva extra virgen en el período de gestación temprana, mostrando nuestros resultados que se evidencian alteraciones en la vía de prolactina en esta etapa incluso cuando a nivel fetal esta alteración se previene.

Por otro lado, a diferencia de lo observado en el útero decidualizado y en la decidua en gestación temprana en la descendencia de ratas diabéticas, no se observaron anomalías en los niveles de FABP4 en la etapa fetal, lo que sugiere que esta proteína se afecta en forma postnatal o en vinculación con la inducción de la decidualización. La programación fetal involucra múltiples cambios epigenéticos, que pueden muchas veces expresarse solamente en algunas etapas de la vida (Stevenson *et al.*, 2020), siendo en este caso evidente en período postnatal y cuando el útero está decidualizado. Futuros estudios en el útero de la descendencia no decidualizado permitirán evaluar la influencia hormonal sobre la inducción de esta proteína clave en la decidualización y función metabólica (Tian *et al.*, 2011; Kralisch y Fasshauer 2013).

Al evaluar la expresión génica de los PPAR, no se observaron cambios significativos en los niveles de ARNm de *Ppara* ni en su regulador negativo miR-21 en el útero fetal de ratas diabéticas, mostrando que las anomalías evidenciadas en esta vía se inducen en forma postnatal en la descendencia de ratas con diabetes. De manera consistente, en el útero fetal de rata diabética, miR-21, cuyo blanco es *Ppara* (Chuppa *et al.*, 2018), no presenta alteraciones en este órgano fetal. Tampoco los genes blancos de miR-21: *Pten* y *Foxo1* (Song *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2021) mostraron cambios en su expresión. Al ser *Pten* y *Foxo1* reguladores negativos de la vía de mTOR, nuestros resultados sugieren que posiblemente esta vía no se encuentre afectada en el útero fetal de ratas diabéticas, si

bien sería necesario evaluar en futuros estudios la actividad de la vía de mTOR en el útero fetal.

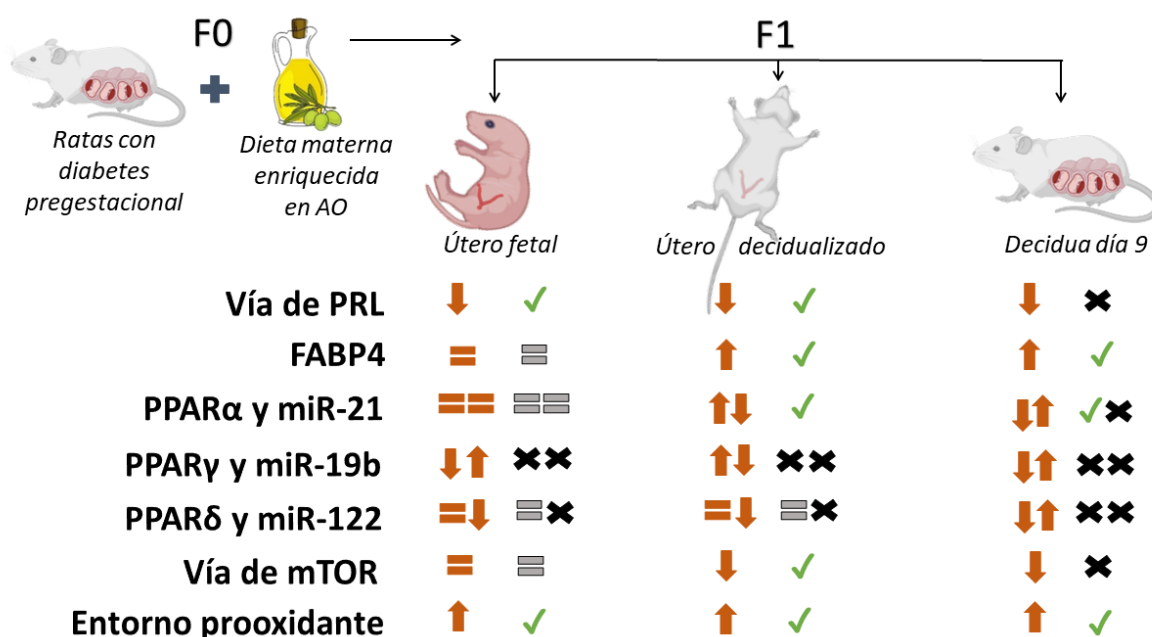
En el útero de fetos de ratas diabéticas se evidenció una menor expresión de *Pparg*, alteración semejante a la que previamente se evidenció en la decidua de rata diabética de día 9 de gestación (Roberti *et al.*, 2023) y como evidenciamos en este estudio en la decidua de la descendencia de rata diabética en el día 9 de gestación. Este hallazgo sugiere que la diabetes materna programa desde la etapa fetal, anomalías en este relevante regulador de la función metabólica, del entorno proinflamatorio y del desarrollo (Jawerbaum y Capobianco 2011; Wahli y Michalik 2012). En este contexto, nuestros resultados indican que esta disminución podría estar mediada por la sobreexpresión de miR-19b y miR-155, reguladores negativos de PPAR γ (Tryggstad *et al.*, 2019; Juiz-Valina *et al.*, 2022), y cuyos niveles evidenciamos se modulan en forma opuesta a la expresión de este receptor nuclear tanto en la etapa fetal como prepuberal y postnatal. Es importante destacar que la suplementación materna con aceite de oliva extra virgen no logró prevenir estas alteraciones en la expresión de *Pparg* ni en la regulación de miR-19b y miR-155, ni en el útero fetal de rata diabética, ni en el útero decidualizado de la progenie de ratas diabéticas en etapas prepuberal y de gestación temprana. Estudios previos del laboratorio muestran que dietas ricas en aceite de oliva extra virgen tampoco lograron regular alteraciones en los niveles de PPAR γ ni en la placenta de ratas diabéticas ni en la placenta de pacientes con diabetes (Capobianco *et al.*, 2018b; Gomez Ribot *et al.*, 2020), sugiriendo cambios epigenéticos estables y difíciles de regular mediante tratamientos enriquecidos con aceite de oliva extra virgen, un potente agente nutrigenómico (Piroddi *et al.*, 2017; De Santis *et al.*, 2019).

De forma similar a lo observado al estudiar al útero decidualizado de la descendencia de ratas con diabetes, no se observaron anomalías en los niveles de *Ppard* en el útero fetal de ratas diabéticas. Sin embargo, al analizar la expresión de miR-122, sus niveles se encontraron reducidos. Dado que, en la decidua de la descendencia de rata diabética en la gestación temprana, niveles elevados de miR-122 se vinculan a niveles reducidos de PPAR δ , la ausencia de cambios en PPAR δ en las etapas fetal y prepuberal ante los anómalos niveles de este microRNA podría estar vinculada a mecanismos compensatorios que estén preservando su expresión.

De interés, miR-122 ha sido previamente asociado con la regulación de *Sirt1*, un factor clave en procesos metabólicos y en el proceso de decidualización (Boutant y Canto 2014; Hwang *et al.*, 2022). Nuestros resultados sugieren que la reducción de los niveles de miR-122 podría estar vinculado con los niveles elevados de *Sirt1* observados tanto en el útero fetal de ratas diabéticas como en la descendencia de ratas diabéticas en etapa prepuberal. Serán de interés futuros estudios que evalúen los niveles proteicos de esta sirtuina, y establezcan su potencial efecto benéfico a nivel metabólico y en el desarrollo decidual.

En relación con el entorno proinflamatorio y expresión de enzimas antioxidantes, no encontramos cambios en los niveles de ARNm de *Mmp9*, *Cat* y *Mnsod* en el útero fetal de ratas diabéticas. Sin embargo, un hallazgo relevante fue la mayor expresión de *Cat* y *Mnsod* en el útero fetal de ratas diabéticas que recibieron suplementación dietaria con aceite de oliva extra virgen durante la gestación. La capacidad de regular enzimas antioxidantes es un efecto clásico del aceite de oliva extra virgen (Piroddi *et al.*, 2017; Santa-Maria *et al.*, 2023), sugiriendo en el contexto de nuestros resultados que esta suplementación dietaria, podría ejercer un efecto protector, promoviendo la expresión de enzimas clave en la defensa antioxidante, efecto que podría contrarrestar parcialmente el daño oxidativo asociado con la diabetes materna.

Al estudiar un clásico marcador del entorno prooxidante, evidenciamos niveles elevados de 4-HNE en el útero fetal de ratas diabéticas, resultado que sugiere que el entorno intrauterino prooxidante y proinflamatorio inducido por la diabetes materna (Jawerbaum y Gonzalez 2006; Lappas *et al.*, 2011), afecta en forma directa al útero fetal. De interés, esta alteración fue prevenida por la dieta materna suplementada con aceite de oliva extra virgen, prevención que también se evidencia al estudiar al útero decidualizado y la decidua en etapa temprana de preñez en la descendencia de rata diabética.



Esquema 10: Efecto del tratamiento de aceite de oliva extra virgen (AO) brindado durante la gestación a ratas con diabetes pregestacional (F0), en el útero del feto, en el útero de la descendencia en etapa prepuberal, y en la decidua de la descendencia en gestación temprana (F1). El color rojo corresponde al grupo diabético, los colores verde y gris corresponden al grupo diabético con el tratamiento dietario materno enriquecido en AO. Las flechas (↑↓) indican el incremento o la disminución de las vías evaluadas en relación al grupo control, los signos (=) indican las vías que permanecen sin cambios. Las tildes (✓) indican cuando el tratamiento con AO reguló la vía indicada. Las cruces (X) indican que el tratamiento materno enriquecido en AO no reguló las vías indicadas.

*En conjunto, tal como se esquematiza en el **esquema 10** podemos destacar que la diabetes materna afecta al útero fetal y programa en la descendencia múltiples alteraciones vinculadas a los procesos de decidualización y función decidual, evidentes tanto en el útero deciduado de la cría prepúber como en la decidua de rata en etapa de gestación temprana. En forma importante, nuestros resultados señalan la importancia de la dieta materna en la modulación del entorno fetal y sugieren que la suplementación con aceite de oliva extra virgen podría representar una estrategia efectiva para reducir, al menos en parte, los efectos adversos de la diabetes materna sobre el útero del feto en desarrollo y la consecuente programación fetal de alteraciones*

deciduales evidentes ante la inducción de decidualización en ratas prepúberes y más difíciles de revertir a nivel decidual en el complejo entorno propio de la gestación temprana.

Conclusiones

- La diabetes materna induce programación de alteraciones en el útero de la descendencia de ratas, mostrando alteraciones en marcadores clave del proceso de decidualización en el útero decidualizado de crías en etapa prepuberal. Estas alteraciones también se evidencian en la descendencia de ratas diabéticas en la gestación temprana.
- Las vías de los PPAR y de mTOR, relevantes en el proceso de decidualización, se encuentran alteradas, en forma paralela a la desregulación de microRNAs que modulan estas vías, en el útero de las crías de ratas diabéticas en etapa prepuberal.
- Una diferente desregulación de las vías de los PPAR y mTOR, también vinculada a la desregulación de microRNAs que regulan estas vías, se evidencia cuando se estudia la decidua de la descendencia de ratas con diabetes en la gestación temprana.
- Se evidenció un entorno prooxidante/proinflamatorio en el útero decidualizado de la descendencia prepúber de ratas diabéticas. También se evidenció un entorno prooxidante en la decidua de la descendencia de ratas con diabetes en gestación temprana.
- Varias de las alteraciones programadas en el útero decidualizado de ratas prepúberes y en la decidua en la gestación de la descendencia de rata diabética, están incluso presentes desde el período fetal, ya que fueron evidenciadas cuando se estudia al útero de fetos hembra en la gestación de la F0 a término.
- La suplementación dietaria materna con aceite de oliva extra virgen durante la gestación tuvo efectos beneficiosos en la prevención de la programación de varias alteraciones en las vías moleculares involucradas en la decidualización y el desarrollo uterino de la descendencia de ratas con diabetes. En efecto, fue capaz de prevenir el entorno prooxidante/proinflamatorio y reguló los niveles de proteínas clave en la función y desarrollo del útero y de la decidua. Además, este

tratamiento moduló, al menos en parte, vías de relevancia en la deciduización como son las vías de los PPAR y de mTOR, efectos posiblemente vinculados a la regulación de microRNAs.

Estos hallazgos sugieren que la diabetes materna induce cambios moleculares en el útero de sus fetos durante el desarrollo, que afectará vías clave de la deciduización a lo largo de la vida de la progenie, y que podrían tener consecuencias en su salud reproductiva y afectar a su propia progenie durante el desarrollo. En forma importante, la intervención dietaria con aceite de oliva extra virgen en la gestación podría ser un tratamiento potencial para prevenir, al menos en parte, los efectos adversos de la diabetes materna sobre la función uterina y decidua de la descendencia.



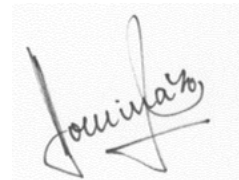
Lic. Cintia R. Gatti

Tesista Doctoral



Dra. Alicia Jawerbaum

Directora



Dra. Romina Higa

Directora Adjunta

Bibliografía

- 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.
- Abrahamsohn, P. A. y T. M. Zorn (1993). **"Implantation and decidualization in rodents."** *J Exp Zool* **266**(6): 603-28.
- Afroz, A., M. J. Alramadan, M. N. Hossain, L. Romero, K. Alam, D. J. Magliano y B. Billah (2018). **"Cost-of-illness of type 2 diabetes mellitus in low and lower-middle income countries: a systematic review."** *BMC Health Serv Res* **18**(1): 972.
- Ahmadian, M., J. M. Suh, N. Hah, C. Liddle, A. R. Atkins, M. Downes y R. M. Evans (2013). **"PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future."** *Nat Med* **19**(5): 557-66.
- Al-Awar, A., K. Kupai, M. Veszelka, G. Szucs, Z. Attieh, Z. Murlasits, S. Torok, A. Posa y C. Varga (2016). **"Experimental Diabetes Mellitus in Different Animal Models."** *J Diabetes Res* **2016**: 9051426.
- Al-Ofi, E. A. (2019). **"Implications of inflammation and insulin resistance in obese pregnant women with gestational diabetes: A case study."** *SAGE Open Med Case Rep* **7**: 2050313X19843737.
- Alejandro, E. U., T. P. Mamerto, G. Chung, A. Villavieja, N. L. Gaus, E. Morgan y M. R. B. Pineda-Cortel (2020). **"Gestational Diabetes Mellitus: A Harbinger of the Vicious Cycle of Diabetes."** *Int J Mol Sci* **21**(14).
- Arck, P. C. y K. Hecher (2013). **"Fetomaternal immune cross-talk and its consequences for maternal and offspring's health."** *Nat Med* **19**(5): 548-56.
- Auffret, J., M. Freemerk, N. Carre, Y. Mathieu, C. Turrel-Cuzin, M. Lombes, J. Movassat y N. Binart (2013). **"Defective prolactin signaling impairs pancreatic beta-cell development during the perinatal period."** *Am J Physiol Endocrinol Metab* **305**(10): E1309-18.
- Balasuriya, C. N. D., A. K. Stunes, M. P. Mosti, B. Schei, M. S. Indredavik, I. K. Hals, K. A. I. Evensen y U. Syversen (2018). **"Metabolic Outcomes in Adults Born Preterm With Very Low Birthweight or Small for Gestational Age at Term: A Cohort Study."** *J Clin Endocrinol Metab* **103**(12): 4437-4446.
- Bao, L., C. Tessier, A. Prigent-Tessier, F. Li, O. L. Buzzio, E. A. Callegari, N. D. Horseman y G. Gibori (2007). **"Decidual prolactin silences the expression of genes detrimental to pregnancy."** *Endocrinology* **148**(5): 2326-34.
- Barak, Y., D. Liao, W. He, E. S. Ong, M. C. Nelson, J. M. Olefsky, R. Boland y R. M. Evans (2002). **"Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1): 303-8.
- 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): 585-95.
- Barak, Y., Y. Sadovsky y T. Shalom-Barak (2008). **"PPAR Signaling in Placental Development and Function."** *PPAR Res* **2008**: 142082.
- Barbour, L. A. (2019). **"Metabolic Culprits in Obese Pregnancies and Gestational Diabetes Mellitus: Big Babies, Big Twists, Big Picture : The 2018 Norbert Freinkel Award Lecture."** *Diabetes Care* **42**(5): 718-726.
- Bardugo, A., C. D. Bendor, R. S. Rotem, A. M. Tsur, E. Derazne, H. C. Gerstein, D. Tzur, O. Pinhas-Hamiel, T. Cukierman-Yaffe, I. Raz, M. Hod, A. Tirosh, Y. Lebenthal, A. Afek, G. Chodick y G. Twig (2023). **"Glucose intolerance in pregnancy and risk of early-onset type 2 diabetes: a population-based cohort study."** *Lancet Diabetes Endocrinol* **11**(5): 333-344.
- Barker, D. J. y K. L. Thornburg (2013). **"The obstetric origins of health for a lifetime."** *Clin Obstet Gynecol* **56**(3): 511-9.

- Basarir Sivri, F. N. y S. Ciftci (2024). **"A New Insight into Fatty Acid Binding Protein 4 Mechanisms and Therapeutic Implications in Obesity-Associated Diseases: A Mini Review."** Mol Nutr Food Res **68**(8): e2300840.
- Bazer, F. W. y T. E. Spencer (2011). **"Hormones and pregnancy in eutherian mammals."** In Hormones and reproduction of vertebrates: 73-94.
- Beamer, B. A., C. Negri, C. J. Yen, O. Gavrilova, J. M. Rumberger, M. J. Durcan, D. P. Yarnall, A. L. Hawkins, C. A. Griffin, D. K. Burns, J. Roth, M. Reitman y A. R. Shuldiner (1997). **"Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferator activated receptor-gamma (hPPAR gamma) gene."** Biochem Biophys Res Commun **233**(3): 756-9.
- Bensinger, S. J. y P. Tontonoz (2008). **"Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors."** Nature **454**(7203): 470-7.
- Berger, J. y D. E. Moller (2002). **"The mechanisms of action of PPARs."** Annu Rev Med **53**: 409-35.
- Berkhout, R. P., C. B. Lambalk, S. Repping, G. Hamer y S. Mastenbroek (2020). **"Premature expression of the decidualization marker prolactin is associated with repeated implantation failure."** Gynecol Endocrinol **36**(4): 360-364.
- Berry, E. B., R. Eykholt, R. J. Helliwell, R. S. Gilmour, M. D. Mitchell y K. W. Marvin (2003). **"Peroxisome proliferator-activated receptor isoform expression changes in human gestational tissues with labor at term."** Mol Pharmacol **64**(6): 1586-90.
- 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): 37254-9.
- 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.
- Boron, W. F. y E. L. Boulpaep (2016). **"Medical Physiology E-book."** Elsevier Health Sciences.
- Bougarne, N., B. Weyers, S. J. Desmet, J. Deckers, D. W. Ray, B. Staels y K. De Bosscher (2018). **"Molecular Actions of PPARalpha in Lipid Metabolism and Inflammation."** Endocr Rev **39**(5): 760-802.
- Boutant, M. y C. Canto (2014). **"SIRT1 metabolic actions: Integrating recent advances from mouse models."** Mol Metab **3**(1): 5-18.
- 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**: 248-54.
- Bradley, R. L., F. F. Fisher y E. Maratos-Flier (2008). **"Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF-alpha and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes."** Obesity (Silver Spring) **16**(5): 938-44.
- Broughton, J. P., M. T. Lovci, J. L. Huang, G. W. Yeo y A. E. Pasquinelli (2016). **"Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity."** Mol Cell **64**(2): 320-333.
- Burton, G. J., T. Cindrova-Davies y M. Y. Turco (2020). **"Review: Histotrophic nutrition and the placental-endometrial dialogue during human early pregnancy."** Placenta **102**: 21-26.
- Burton, G. J. y E. Jauniaux (2023). **"The human placenta: new perspectives on its formation and function during early pregnancy."** Proc Biol Sci **290**(1997): 20230191.
- Cabral-Pacheco, G. A., I. Garza-Veloz, C. Castruita-De la Rosa, J. M. Ramirez-Acuna, B. A. Perez-Romero, J. F. Guerrero-Rodriguez, N. Martinez-Avila y M. L. Martinez-Fierro (2020). **"The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases."** Int J Mol Sci **21**(24).
- Calnan, D. R. y A. Brunet (2008). **"The FoxO code."** Oncogene **27**(16): 2276-88.
- Cameo, P., S. Srisuparp, Z. Strakova y A. T. Fazleabas (2004). **"Chorionic gonadotropin and uterine dialogue in the primate."** Reprod Biol Endocrinol **2**: 50.

- Capobianco, E., D. Fornes, I. Linenberg, T. L. Powell, T. Jansson y A. Jawerbaum (2016). **"A novel rat model of gestational diabetes induced by intrauterine programming is associated with alterations in placental signaling and fetal overgrowth."** Mol Cell Endocrinol **422**: 221-32.
- Capobianco, E., D. Fornes, S. L. Roberti, T. L. Powell, T. Jansson y A. Jawerbaum (2018a). **"Supplementation with polyunsaturated fatty acids in pregnant rats with mild diabetes normalizes placental PPARGamma and mTOR signaling in female offspring developing gestational diabetes."** J Nutr Biochem **53**: 39-47.
- Capobianco, E., D. Gomez Ribot, D. Fornes, T. L. Powell, C. Levieux, T. Jansson y A. Jawerbaum (2018b). **"Diet Enriched with Olive Oil Attenuates Placental Dysfunction in Rats with Gestational Diabetes Induced by Intrauterine Programming."** Mol Nutr Food Res **62**(19): e1800263.
- 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.
- Carter, A. M. y A. C. Enders (2016). **"Placentation in mammals: Definitive placenta, yolk sac, and paraplacenta."** Theriogenology **86**(1): 278-87.
- Catalano, P. M. (2014). **"Trying to understand gestational diabetes."** Diabet Med **31**(3): 273-81.
- Charalambous, M., M. Cowley, F. Geoghegan, F. M. Smith, E. J. Radford, B. P. Marlow, C. F. Graham, L. D. Hurst y A. Ward (2010). **"Maternally-inherited Grb10 reduces placental size and efficiency."** Dev Biol **337**(1): 1-8.
- Chen, C. C., S. M. Jeon, P. T. Bhaskar, V. Nogueira, D. Sundararajan, I. Tonic, Y. Park y N. Hay (2010). **"FoxOs inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor."** Dev Cell **18**(4): 592-604.
- Christian, M., X. Zhang, T. Schneider-Merck, T. G. Unterman, B. Gellersen, J. O. White y J. J. Brosens (2002). **"Cyclic AMP-induced forkhead transcription factor, FKHR, cooperates with CCAAT/enhancer-binding protein beta in differentiating human endometrial stromal cells."** J Biol Chem **277**(23): 20825-32.
- Chuppa, S., M. Liang, P. Liu, Y. Liu, M. C. Casati, A. W. Cowley, L. Patullo y A. J. Kriegel (2018). **"MicroRNA-21 regulates peroxisome proliferator-activated receptor alpha, a molecular mechanism of cardiac pathology in Cardiorenal Syndrome Type 4."** Kidney Int **93**(2): 375-389.
- Codogno, P. y A. J. Meijer (2005). **"Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death."** Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1509-18.
- Colaianne, F., V. Zelli, C. Compagnoni, M. S. Miscione, M. Rossi, D. Vecchiotti, M. Di Padova, E. Alesse, F. Zazzeroni y A. Tessitore (2024). **"Role of Circulating microRNAs in Liver Disease and HCC: Focus on miR-122."** Genes (Basel) **15**(10).
- Condon, K. J. y D. M. Sabatini (2019). **"Nutrient regulation of mTORC1 at a glance."** J Cell Sci **132**(21).
- Cornejo-Cortes, M. A., C. Sanchez-Torres, J. C. Vazquez-Chagoyan, H. M. Suarez-Gomez, G. Garrido-Farina y M. A. Meraz-Rios (2006). **"Rat embryo quality and production efficiency are dependent on gonadotrophin dose in superovulatory treatments."** Lab Anim **40**(1): 87-95.
- Correia-Branco, A., E. Keating y F. Martel (2018). **"Involvement of mTOR, JNK and PI3K in the negative effect of ethanol and metformin on the human first-trimester extravillous trophoblast HTR-8/SVneo cell line."** Eur J Pharmacol **833**: 16-24.
- Correia, B., M. I. Sousa y J. Ramalho-Santos (2020). **"The mTOR pathway in reproduction: from gonadal function to developmental coordination."** Reproduction **159**(4): R173-R188.
- Council, S. o. L. A. N. N. R. (1995). Nutrient Requirements of the Laboratory Rat. Nutrient Requirements of Laboratory Animals. N. A. PRESS. Whashington, DC, NATIONAL ACADEMY PRESS: 11-79.

- Dai, D., B. C. Moulton y T. F. Ogle (2000). **"Regression of the decidualized mesometrium and decidual cell apoptosis are associated with a shift in expression of Bcl2 family members."** *Biol Reprod* **63**(1): 188-95.
- Darenskaya, M. A., L. I. Kolesnikova y S. I. Kolesnikov (2021). **"Oxidative Stress: Pathogenetic Role in Diabetes Mellitus and Its Complications and Therapeutic Approaches to Correction."** *Bull Exp Biol Med* **171**(2): 179-189.
- de Gennaro, G., G. Palla, L. Battini, T. Simoncini, S. Del Prato, A. Bertolotto y C. Bianchi (2019). **"The role of adipokines in the pathogenesis of gestational diabetes mellitus."** *Gynecol Endocrinol* **35**(9): 737-751.
- De Santis, S., M. Cariello, E. Piccinin, C. Sabba y A. Moschetta (2019). **"Extra Virgin Olive Oil: Lesson from Nutrigenomics."** *Nutrients* **11**(9).
- Deshpande, S., T. I. Kinnunen, A. Khadilkar, J. Unni, V. Khanijo, N. Donga y S. Kulathinal (2023). **"Pre-pregnancy weight, the rate of gestational weight gain, and the risk of early gestational diabetes mellitus among women registered in a tertiary care hospital in India."** *BMC Pregnancy Childbirth* **23**(1): 586.
- Desvergne, B., L. Michalik y W. Wahli (2006). **"Transcriptional regulation of metabolism."** *Physiol Rev* **86**(2): 465-514.
- Dham, D., B. Roy, A. Gowda, G. Pan, A. Sridhar, X. Zeng, R. A. Thandavarayan y S. S. Palaniyandi (2021). **"4-Hydroxy-2-nonenal, a lipid peroxidation product, as a biomarker in diabetes and its complications: challenges and opportunities."** *Free Radic Res* **55**(5): 547-561.
- Dharap, A., C. Pokrzywa, S. Murali, G. Pandi y R. Vemuganti (2013). **"MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene."** *PLoS One* **8**(11): e79467.
- Diaz, L., I. Martinez-Reza, R. Garcia-Becerra, L. Gonzalez, F. Larrea y I. Mendez (2011). **"Calcitriol stimulates prolactin expression in non-activated human peripheral blood mononuclear cells: breaking paradigms."** *Cytokine* **55**(2): 188-94.
- Duca, R. B., C. Massillo, P. L. Farre, K. D. Grana, J. Moro, K. Gardner, E. Lacunza y A. De Siervi (2022). **"Hsa-miR-133a-3p, miR-1-3p, GOLPH3 and JUP combination results in a good biomarker to distinguish between prostate cancer and non-prostate cancer patients."** *Front Oncol* **12**: 997457.
- Dumortier, O., B. Blondeau, B. Duvillie, B. Reusens, B. Breant y C. Remacle (2007). **"Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet."** *Diabetologia* **50**(12): 2495-503.
- Dunn-Albanese, L. R., W. E. t. Ackerman, Y. Xie, J. D. Iams y D. A. Kniss (2004). **"Reciprocal expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and cyclooxygenase-2 in human term parturition."** *Am J Obstet Gynecol* **190**(3): 809-16.
- Dunne, F., C. Newman, A. Alvarez-Iglesias, J. Ferguson, A. Smyth, M. Browne, P. O'Shea, D. Devane, P. Gillespie, D. Bogdanet, O. Kgosidialwa, A. Egan, Y. Finn, G. Gaffney, A. Khattak, D. O'Keeffe, A. Liew y M. O'Donnell (2023). **"Early Metformin in Gestational Diabetes: A Randomized Clinical Trial."** *JAMA* **330**(16): 1547-1556.
- Eidem, I., S. Vangen, K. F. Hanssen, S. E. Vollset, T. Henriksen, G. Joner y L. C. Stene (2011). **"Perinatal and infant mortality in term and preterm births among women with type 1 diabetes."** *Diabetologia* **54**(11): 2771-8.
- Eijkelenboom, A. y B. M. Burgering (2013). **"FOXOs: signalling integrators for homeostasis maintenance."** *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(2): 83-97.
- el-Banna, A. A. y E. S. Hafez (1972). **"The uterine cervix in mammals."** *Am J Obstet Gynecol* **112**(1): 145-64.
- Eleazu, C. O., K. C. Eleazu, S. Chukwuma y U. N. Essien (2013). **"Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans."** *J Diabetes Metab Disord* **12**(1): 60.

- Ema, M., A. Harazono, A. Hirose y E. Kamata (2003). **"Protective effects of progesterone on implantation failure induced by dibutyltin dichloride in rats."** *Toxicol Lett* **143**(2): 233-8.
- Favaro, R. R., J. M. Murrieta-Coxca, R. N. Gutierrez-Samudio, D. M. Morales-Prieto y U. R. Markert (2021). **"Immunomodulatory properties of extracellular vesicles in the dialogue between placental and immune cells."** *Am J Reprod Immunol* **85**(2): e13383.
- Feng, Z., H. Zhang, A. J. Levine y S. Jin (2005). **"The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells."** *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(23): 8204-9.
- Fetita, L. S., E. Sobngwi, P. Serradas, F. Calvo y J. F. Gautier (2006). **"Consequences of fetal exposure to maternal diabetes in offspring."** *J Clin Endocrinol Metab* **91**(10): 3718-24.
- Figueras, F. y E. Meler (2022). **"Fetal growth patterns as early markers of fetal programming."** *Lancet Diabetes Endocrinol* **10**(10): 683-684.
- Fonseca, B. M., G. Correia-da-Silva y N. A. Teixeira (2012). **"The rat as an animal model for fetoplacental development: a reappraisal of the post-implantation period."** *Reprod Biol* **12**(2): 97-118.
- 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): 803-12.
- Fornes, D., D. Gomez Ribot, F. Heinecke, S. L. Roberti, E. Capobianco y A. Jawerbaum (2020). **"Maternal diets enriched in olive oil regulate lipid metabolism and levels of PPARs and their coactivators in the fetal liver in a rat model of gestational diabetes mellitus."** *J Nutr Biochem* **78**: 108334.
- Fornes, D., V. White, R. Higa, F. Heinecke, E. Capobianco y A. Jawerbaum (2018). **"Sex-dependent changes in lipid metabolism, PPAR pathways and microRNAs that target PPARs in the fetal liver of rats with gestational diabetes."** *Mol Cell Endocrinol* **461**: 12-21.
- Fourcade, G., B. M. Colombo, S. Gregoire, A. Baeyens, L. Rachdi, F. Guez, V. Goffin, R. Scharfmann y B. L. Salomon (2013). **"Fetal pancreas transplants are dependent on prolactin for their development and prevent type 1 diabetes in syngeneic but not allogeneic mice."** *Diabetes* **62**(5): 1646-55.
- Fowler, D. J., K. H. Nicolaides y J. P. Miell (2000). **"Insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1): a multifunctional role in the human female reproductive tract."** *Hum Reprod Update* **6**(5): 495-504.
- Franzago, M., F. Fraticelli, L. Stuppia y E. Vitacolonna (2019). **"Nutrigenetics, epigenetics and gestational diabetes: consequences in mother and child."** *Epigenetics* **14**(3): 215-235.
- Fredenrich, A. y P. A. Grimaldi (2005). **"PPAR delta: an incompletely known nuclear receptor."** *Diabetes Metab* **31**(1): 23-7.
- Freeman, M. E., B. Kanyicska, A. Lerant y G. Nagy (2000). **"Prolactin: structure, function, and regulation of secretion."** *Physiol Rev* **80**(4): 1523-631.
- Freemark, M., M. Nagano, M. Edery y P. A. Kelly (1995). **"Prolactin receptor gene expression in the fetal rat."** *J Endocrinol* **144**(2): 285-92.
- Friedrichs, W., S. B. Ruparel, R. A. Marciniak y L. deGraffenried (2011). **"Omega-3 fatty acid inhibition of prostate cancer progression to hormone independence is associated with suppression of mTOR signaling and androgen receptor expression."** *Nutr Cancer* **63**(5): 771-7.
- Ganeff, C., G. Chatel, C. Munaut, F. Frankenhe, J. M. Foidart y R. Winkler (2009). **"The IGF system in in-vitro human decidualization."** *Mol Hum Reprod* **15**(1): 27-38.
- Geneser, F. (2000). **"Órganos de la reproducción."** *En histología. Sobre bases biomoleculares* **3**: 638-663.
- Giacoppo, S., F. Pollastro, G. Grassi, P. Bramanti y E. Mazzone (2017). **"Target regulation of PI3K/Akt/mTOR pathway by cannabidiol in treatment of experimental multiple sclerosis."** *Fitoterapia* **116**: 77-84.

- Go, H., J. Y. Jang, P. J. Kim, Y. G. Kim, S. J. Nam, J. H. Paik, T. M. Kim, D. S. Heo, C. W. Kim y Y. K. Jeon (2015). **"MicroRNA-21 plays an oncogenic role by targeting FOXO1 and activating the PI3K/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma."** *Oncotarget* **6**(17): 15035-49.
- Gomez Ribot, D., E. Diaz, M. V. Fazio, H. L. Gomez, V. Careaga, M. Maier, S. B. Macchi, C. A. Gresta, E. Capobianco y A. Jawerbaum (2023). **"Metabolic and molecular effects of dietary extra virgin olive oil in blood and placenta of women with GDM."** *Front Endocrinol (Lausanne)* **14**: 1219276.
- Gomez Ribot, D., E. Diaz, M. V. Fazio, H. L. Gomez, D. Fornes, S. B. Macchi, C. A. Gresta, E. Capobianco y A. Jawerbaum (2020). **"An extra virgin olive oil-enriched diet improves maternal, placental, and cord blood parameters in GDM pregnancies."** *Diabetes Metab Res Rev*: e3349.
- Gorban de Lapertosa, S., S. Sucani, S. Salzberg, J. Alvarinas, C. Faingold, A. Jawerbaum, G. Rovira y D.-S. Group (2021). **"Prevalence of gestational diabetes mellitus in Argentina according to the Latin American Diabetes Association (ALAD) and International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups (IADPSG) diagnostic criteria and the associated maternal-neonatal complications."** *Health Care Women Int* **42**(4-6): 636-656.
- Goyal, S. N., N. M. Reddy, K. R. Patil, K. T. Nakhate, S. Ojha, C. R. Patil y Y. O. Agrawal (2016). **"Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics."** *Chem Biol Interact* **244**: 49-63.
- Gray, C. A., F. F. Bartol, B. J. Tarleton, A. A. Wiley, G. A. Johnson, F. W. Bazer y T. E. Spencer (2001). **"Developmental biology of uterine glands."** *Biol Reprod* **65**(5): 1311-23.
- Guasch-Ferre, M., F. B. Hu, M. A. Martinez-Gonzalez, M. Fito, M. Bullo, R. Estruch, E. Ros, D. Corella, J. Recondo, E. Gomez-Gracia, M. Fiol, J. Lapetra, L. Serra-Majem, M. A. Munoz, X. Pinto, R. M. Lamuela-Raventos, J. Basora, P. Buil-Cosiales, J. V. Sorli, V. Ruiz-Gutierrez, J. A. Martinez y J. Salas-Salvado (2014). **"Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study."** *BMC Med* **12**: 78.
- Guertin, D. A. y D. M. Sabatini (2007). **"Defining the role of mTOR in cancer."** *Cancer Cell* **12**(1): 9-22.
- Guo, X., H. Yi, T. C. Li, Y. Wang, H. Wang y X. Chen (2021). **"Role of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Human Embryo Implantation: Clinical Implications."** *Biomolecules* **11**(2).
- Gupta, M. B. y T. Jansson (2019). **"Novel roles of mechanistic target of rapamycin signaling in regulating fetal growthdagger."** *Biol Reprod* **100**(4): 872-884.
- Gurha, P., T. Wang, A. H. Larimore, Y. Sassi, C. Abreu-Goodger, M. O. Ramirez, A. K. Reddy, S. Engelhardt, G. E. Taffet, X. H. Wehrens, M. L. Entman y A. Rodriguez (2013). **"microRNA-22 promotes heart failure through coordinate suppression of PPAR/ERR-nuclear hormone receptor transcription."** *PLoS One* **8**(9): e75882.
- Ha, M. y V. N. Kim (2014). **"Regulation of microRNA biogenesis."** *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**(8): 509-24.
- Hales, C. N. y D. J. Barker (2013). **"Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. 1992."** *Int J Epidemiol* **42**(5): 1215-22.
- Hannah, W., B. Bhavadharini, H. Beks, M. Deepa, R. M. Anjana, R. Uma, E. Martin, K. McNamara, V. Versace, P. Saravanan y V. Mohan (2022). **"Global burden of early pregnancy gestational diabetes mellitus (eGDM): A systematic review."** *Acta Diabetol* **59**(3): 403-427.
- Harding, J. L., M. E. Pavkov, D. J. Magliano, J. E. Shaw y E. W. Gregg (2019). **"Global trends in diabetes complications: a review of current evidence."** *Diabetologia* **62**(1): 3-16.
- Harreiter, J. y M. Roden (2019). **"[Diabetes mellitus-Definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2019)]."** *Wien Klin Wochenschr* **131**(Suppl 1): 6-15.

- Harrington, L. S., G. M. Findlay y R. F. Lamb (2005). **"Restraining PI3K: mTOR signalling goes back to the membrane."** *Trends Biochem Sci* **30**(1): 35-42.
- 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): 18527-33.
- He, Y., N. Wu, W. Yu, L. Li, H. OuYang, X. Liu, M. Qian y A. Al-Mureish (2020). **"Research Progress on the Experimental Animal Model of Gestational Diabetes Mellitus."** *Diabetes Metab Syndr Obes* **13**: 4235-4247.
- Higa, R. y A. Jawerbaum (2013). **"Intrauterine effects of impaired lipid homeostasis in pregnancy diseases."** *Curr Med Chem* **20**(18): 2338-50.
- 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., S. Roberti, E. Capobianco, D. Fornes, V. White y A. Jawerbaum (2017). **"Pro-oxidant/pro-inflammatory alterations in the offspring's heart of mild diabetic rats are regulated by maternal treatments with a mitochondrial antioxidant. "** *Reprod Toxicol*.
- 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* **49C**: 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): 286-95.
- Higashiyama, H., A. N. Billin, Y. Okamoto, M. Kinoshita y S. Asano (2007). **"Expression profiling of peroxisome proliferator-activated receptor-delta (PPAR-delta) in mouse tissues using tissue microarray."** *Histochem Cell Biol* **127**(5): 485-94.
- Hihi, A. K., L. Michalik y W. Wahli (2002). **"PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives."** *Cell Mol Life Sci* **59**(5): 790-8.
- Hirota, Y. (2019). **"Progesterone governs endometrial proliferation-differentiation switching and blastocyst implantation."** *Endocr J* **66**(3): 199-206.
- Hirotsani, M., T. Tsukamoto, J. Bourdeaux, H. Sadano y T. Osumi (2001). **"Stabilization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by the ligand."** *Biochem Biophys Res Commun* **288**(1): 106-10.
- Hivert, M. F., H. Backman, K. Benhalima, P. Catalano, G. Desoye, J. Immanuel, C. J. D. McKinlay, C. L. Meek, C. J. Nolan, U. Ram, A. Sweeting, D. Simmons y A. Jawerbaum (2024). **"Pathophysiology from preconception, during pregnancy, and beyond."** *Lancet* **404**(10448): 158-174.
- Holme, A. M. y V. Sitras (2020). **"Developmental origin of health and disease-Evidence and time for action."** *Acta Obstet Gynecol Scand* **99**(8): 961-962.
- Horseman, N. D., W. Zhao, E. Montecino-Rodriguez, M. Tanaka, K. Nakashima, S. J. Engle, F. Smith, E. Markoff y K. Dorshkind (1997). **"Defective mammopoiesis, but normal hematopoiesis, in mice with a targeted disruption of the prolactin gene."** *EMBO J* **16**(23): 6926-35.
- Huang, W. (2017). **"MicroRNAs: Biomarkers, Diagnostics, and Therapeutics."** *Methods Mol Biol* **1617**: 57-67.
- Hufnagel, A., L. Dearden, D. S. Fernandez-Twinn y S. E. Ozanne (2022). **"Programming of cardiometabolic health: the role of maternal and fetal hyperinsulinaemia."** *J Endocrinol* **253**(2): R47-R63.
- Hunter, C. M. (2016). **"Understanding diabetes and the role of psychology in its prevention and treatment."** *Am Psychol* **71**(7): 515-525.

- Hussain, T., G. Murtaza, E. Metwally, D. Kalhoro, M. Kalhoro, B. Rahu, R. Sahito, Y. Yin, H. Yang, C. Ml. y T. B. (2021). **"The role of oxidative stress and antioxidant balance in pregnancy."** Mediators of Inflammation. (1):9962860.
- Hwang, Y. J., G. J. Sung, R. Marquardt, S. L. Young, B. A. Lessey, T. H. Kim, Y. P. Cheon y J. W. Jeong (2022). **"SIRT1 plays an important role in implantation and decidualization during mouse early pregnancy."** Biol Reprod 106(6): 1072-1082.
- Immanuel, J. y D. Simmons (2017). **"Screening and Treatment for Early-Onset Gestational Diabetes Mellitus: a Systematic Review and Meta-analysis."** Curr Diab Rep 17(11): 115.
- Ipsaro, J. J. y L. Joshua-Tor (2015). **"From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery."** Nat Struct Mol Biol 22(1): 20-8.
- Ishigame, H., M. S. Medan, G. Watanabe, Z. Shi, H. Kishi, K. Y. Arai y K. Taya (2004). **"A new alternative method for superovulation using passive immunization against inhibin in adult rats."** Biol Reprod 71(1): 236-43.
- Jabbour, H. N. y H. O. Critchley (2001). **"Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy."** Reproduction 121(2): 197-205.
- Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M. A. Ruegg, A. Hall y M. N. Hall (2004). **"Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive."** Nat Cell Biol 6(11): 1122-8.
- Jafri, I. (2023). **"MiRNA a New Insight in Metabolic and Human Diseases: A Review."** Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 69(8): 102-110.
- Janani, C. y B. D. Ranjitha Kumari (2015). **"PPAR gamma gene--a review."** Diabetes Metab Syndr 9(1): 46-50.
- Jansson, N., J. Pettersson, A. Haafiz, A. Ericsson, I. Palmberg, M. Tranberg, V. Ganapathy, T. L. Powell y T. Jansson (2006). **"Down-regulation of placental transport of amino acids precedes the development of intrauterine growth restriction in rats fed a low protein diet."** J Physiol 576(Pt 3): 935-46.
- Jansson, N., F. J. Rosario, F. Gaccioli, S. Lager, H. N. Jones, S. Roos, T. Jansson y T. L. Powell (2013). **"Activation of placental mTOR signaling and amino acid transporters in obese women giving birth to large babies."** J Clin Endocrinol Metab 98(1): 105-13.
- Jansson, T., I. L. Aye y D. C. Goberdhan (2012). **"The emerging role of mTORC1 signaling in placental nutrient-sensing."** Placenta 33 Suppl 2(Suppl 2): e23-9.
- Jarmuzek, P., M. Wielgos y D. Bomba-Opon (2015). **"Placental pathologic changes in gestational diabetes mellitus."** Neuro Endocrinol Lett 36(2): 101-5.
- 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: S212-7.
- 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): 1327-42.
- Jawerbaum, A. y E. Gonzalez (2006). **"Diabetic pregnancies: the challenge of developing in a pro-inflammatory environment."** Curr Med Chem 13(18): 2127-38.
- Jawerbaum, A., V. Novaro, A. M. Franchi, M. Gimeno y E. Gonzalez (1998). **"High glucose levels modulate eicosanoid production in uterine and placental tissue from non-insulin-dependent diabetic rats during late pregnancy."** Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 58(6): 389-93.
- Jawerbaum, A. y V. White (2010). **"Animal models in diabetes and pregnancy."** Endocr Rev 31(5): 680-701.
- Jawerbaum, A. y V. White (2017). **"Review on intrauterine programming: Consequences in rodent models of mild diabetes and mild fat overfeeding are not mild."** Placenta 52: 21-32.
- Jones, C. J., R. H. Choudhury y J. D. Aplin (2015). **"Tracking nutrient transfer at the human maternofetal interface from 4 weeks to term."** Placenta 36(4): 372-80.

- Jornayvaz, F. R., P. Vollenweider, M. Bochud, V. Mooser, G. Waeber y P. Marques-Vidal (2016). **"Low birth weight leads to obesity, diabetes and increased leptin levels in adults: the CoLaus study."** *Cardiovasc Diabetol* **15**: 73.
- Juge-Aubry, C. E., E. Hammar, C. Siegrist-Kaiser, A. Pernin, A. Takeshita, W. W. Chin, A. G. Burger y C. A. Meier (1999). **"Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha by phosphorylation of a ligand-independent trans-activating domain."** *J Biol Chem* **274**(15): 10505-10.
- Juiz-Valina, P., B. M. Varela-Rodriguez, E. Outeirino-Blanco, M. J. Garcia-Brao, E. Mena, F. Cordido y S. Sangiao-Alvarellos (2022). **"MiR-19 Family Impairs Adipogenesis by the Downregulation of the PPARGgamma Transcriptional Network."** *Int J Mol Sci* **23**(24).
- 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): 2129-39.
- Kanda, E., Y. Matsuda, Y. Makino y H. Matsui (2012). **"Risk factors associated with altered fetal growth in patients with pregestational diabetes mellitus."** *J Matern Fetal Neonatal Med* **25**(8): 1390-4.
- Kanda, Y., H. Jikihara, E. Markoff y S. Handwerger (1999). **"Interleukin-2 inhibits the synthesis and release of prolactin from human decidual cells."** *J Clin Endocrinol Metab* **84**(2): 677-81.
- Kane, N. M., M. Jones, J. J. Brosens, R. W. Kelly, P. T. Saunders y H. O. Critchley (2010). **"TGFbeta1 attenuates expression of prolactin and IGFBP-1 in decidualized endometrial stromal cells by both SMAD-dependent and SMAD-independent pathways."** *PLoS One* **5**(9): e12970.
- Kaneko, T., M. Endo, S. Tsunoda, Y. Nakagawa y H. Abe (2020). **"Simple induction of pseudopregnancy by artificial stimulation using a sonic vibration in rats."** *Sci Rep* **10**(1): 2729.
- Kelleher, A. M., J. Milano-Foster, S. K. Behura y T. E. Spencer (2018). **"Uterine glands coordinate on-time embryo implantation and impact endometrial decidualization for pregnancy success."** *Nat Commun* **9**(1): 2435.
- Kersten, S. y W. Wahli (2000). **"Peroxisome proliferator activated receptor agonists."** *EXS* **89**: 141-51.
- Khambule, L. y J. A. George (2019). **"The Role of Inflammation in the Development of GDM and the Use of Markers of Inflammation in GDM Screening."** *Adv Exp Med Biol* **1134**: 217-242.
- Kida, K., M. Nakajima, T. Mohri, Y. Oda, S. Takagi, T. Fukami y T. Yokoi (2011). **"PPARalpha is regulated by miR-21 and miR-27b in human liver."** *Pharm Res* **28**(10): 2467-76.
- King, A. J. (2012). **"The use of animal models in diabetes research."** *Br J Pharmacol* **166**(3): 877-94.
- Komar, C. M., O. Braissant, W. Wahli y T. E. Curry, Jr. (2001). **"Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period."** *Endocrinology* **142**(11): 4831-8.
- Komatsu, S., H. Kitai y H. I. Suzuki (2023). **"Network Regulation of microRNA Biogenesis and Target Interaction."** *Cells* **12**(2).
- Konrad, R. J., I. Mikolaenko, J. F. Tolar, K. Liu y J. E. Kudlow (2001). **"The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic beta-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-beta-D-glucosaminidase."** *Biochem J* **356**(Pt 1): 31-41.
- Kralisch, S. y M. Fasshauer (2013). **"Adipocyte fatty acid binding protein: a novel adipokine involved in the pathogenesis of metabolic and vascular disease?"** *Diabetologia* **56**(1): 10-21.
- Kurtz, M., E. Capobianco, V. Careaga, N. Martinez, M. B. Mazzucco, M. Maier y A. Jawerbaum (2014a). **"Peroxisome proliferator-activated receptor ligands regulate lipid content,**

- metabolism, and composition in fetal lungs of diabetic rats." *J Endocrinol* **220**(3): 345-59.
- Kurtz, M., E. Capobianco, N. Martinez, S. Roberti, E. J. Arany y A. Jawerbaum (2014b). **"PPAR ligands improve impaired metabolic pathways in fetal hearts of diabetic rats."** *J Mol Endocrinol* **220**: 354-359.
- Kurtz, M., N. Martinez, E. Capobianco, R. Higa, D. Fornes, V. White y A. Jawerbaum (2012). **"Increased nitric oxide production and gender-dependent changes in PPARalpha expression and signaling in the fetal lung from diabetic rats."** *Mol Cell Endocrinol*.
- Lager, S., T. Jansson y T. L. Powell (2014). **"Differential regulation of placental amino acid transport by saturated and unsaturated fatty acids."** *Am J Physiol Cell Physiol* **307**(8): C738-44.
- Lamas Bervejillo, M. y A. M. Ferreira (2019). **"Understanding Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: From the Structure to the Regulatory Actions on Metabolism."** *Adv Exp Med Biol* **1127**: 39-57.
- Laplante, M. y D. M. Sabatini (2009). **"mTOR signaling at a glance."** *J Cell Sci* **122**(Pt 20): 3589-94.
- Laplante, M. y D. M. Sabatini (2013). **"Regulation of mTORC1 and its impact on gene expression at a glance."** *J Cell Sci* **126**(Pt 8): 1713-9.
- Lappas, M., U. Hiden, G. Desoye, J. Froehlich, S. Hauguel-de Mouzon y A. Jawerbaum (2011). **"The role of oxidative stress in the pathophysiology of gestational diabetes mellitus."** *Antioxid Redox Signal* **15**(12): 3061-100.
- Lendvai, A., M. J. Deutsch, T. Plosch y R. Ensenauer (2016). **"The peroxisome proliferator-activated receptors under epigenetic control in placental metabolism and fetal development."** *Am J Physiol Endocrinol Metab* **310**(10): E797-810.
- Li, W., M. Du, Q. Wang, X. Ma, L. Wu, F. Guo, H. Ji, F. Huang y G. Qin (2017). **"FoxO1 Promotes Mitophagy in the Podocytes of Diabetic Male Mice via the PINK1/Parkin Pathway."** *Endocrinology* **158**(7): 2155-2167.
- Liu, C. y J. D. Lin (2011). **"PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism."** *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **43**(4): 248-57.
- Liu, J. L. y T. S. Wang (2015). **"Systematic Analysis of the Molecular Mechanism Underlying Decidualization Using a Text Mining Approach."** *PLoS One* **10**(7): e0134585.
- Liu, L., F. Xiao, J. Sun, Q. Wang, A. Wang, F. Zhang, Z. Li, X. Wang, Z. Fang y Y. Qiao (2023). **"Hepatocyte-derived extracellular vesicles miR-122-5p promotes hepatic ischemia reperfusion injury by regulating Kupffer cell polarization."** *Int Immunopharmacol* **119**: 110060.
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen (2001). **"Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method."** *Methods* **25**(4): 402-8.
- Lockwood, C. J., C. Oner, Y. H. Uz, U. A. Kayisli, S. J. Huang, L. F. Buchwalder, W. Murk, E. F. Funai y F. Schatz (2008). **"Matrix metalloproteinase 9 (MMP9) expression in preeclamptic decidua and MMP9 induction by tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta in human first trimester decidual cells."** *Biol Reprod* **78**(6): 1064-72.
- Lohmiller, J. J. y P. Sonya (2006). **"Reproduction and Breeding."** *Suckow, MA, et al (Ed.) The Laboratory Rat*: 146-164.
- Long, J. K., W. Dai, Y. W. Zheng y S. P. Zhao (2019). **"miR-122 promotes hepatic lipogenesis via inhibiting the LKB1/AMPK pathway by targeting Sirt1 in non-alcoholic fatty liver disease."** *Mol Med* **25**(1): 26.
- Lowe, W. L., Jr., D. M. Scholtens, A. Kuang, B. Linder, J. M. Lawrence, Y. Lebenthal, D. McCance, J. Hamilton, M. Nodzenski, O. Talbot, W. J. Brickman, P. Clayton, R. C. Ma, W. H. Tam, A. R. Dyer, P. M. Catalano, L. P. Lowe, B. E. Metzger y H. F.-u. S. C. R. Group (2019). **"Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Follow-up Study (HAPO FUS): Maternal Gestational Diabetes Mellitus and Childhood Glucose Metabolism."** *Diabetes Care* **42**(3): 372-380.

- Ly, T. T. G., J. Yun, D. H. Lee, J. S. Chung y S. M. Kwon (2021). **"Protective Effects and Benefits of Olive Oil and Its Extracts on Women's Health."** *Nutrients* **13**(12).
- Ma, H. L., F. Gong, Y. Tang, X. Li, X. Li, X. Yang y G. Lu (2015). **"Inhibition of Endometrial Tiam1/Rac1 Signals Induced by miR-22 Up-Regulation Leads to the Failure of Embryo Implantation During the Implantation Window in Pregnant Mice."** *Biol Reprod* **92**(6): 152.
- Maddaloni, E., C. Moretti, C. Mignogna y R. Buzzetti (2020). **"Adult-onset autoimmune diabetes in 2020: An update."** *Maturitas* **137**: 37-44.
- Maltepe, E., A. I. Bakardjiev y S. J. Fisher (2010). **"The placenta: transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development."** *J Clin Invest* **120**(4): 1016-25.
- Manicone, A. M. y J. K. McGuire (2008). **"Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation."** *Semin Cell Dev Biol* **19**(1): 34-41.
- Manne-Goehler, J., P. Geldsetzer, K. Agoudavi, G. Andall-Brereton, K. K. Aryal, B. W. Bicaba, P. Bovet, G. Brian, M. Dorobantu, G. Gathecha, M. Singh Gurung, D. Guwatudde, M. Msaidie, C. Houehanou, D. Houinato, J. M. A. Jorgensen, G. B. Kagaruki, K. B. Karki, D. Labadarios, J. S. Martins, M. T. Mayige, R. W. McClure, O. Mwalim, J. K. Mwangi, B. Norov, S. Quesnel-Crooks, B. K. Silver, L. Sturua, L. Tsabedze, C. S. Wesseh, A. Stokes, M. Marcus, C. Ebert, J. I. Davies, S. Vollmer, R. Atun, T. W. Barnighausen y L. M. Jaacks (2019). **"Health system performance for people with diabetes in 28 low- and middle-income countries: A cross-sectional study of nationally representative surveys."** *PLoS Med* **16**(3): e1002751.
- Manning, B. D. y L. C. Cantley (2007). **"AKT/PKB signaling: navigating downstream."** *Cell* **129**(7): 1261-74.
- Marano, R. J. y N. Ben-Jonathan (2014). **"Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions."** *Mol Endocrinol* **28**(5): 622-33.
- 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 (2011). **"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.
- Marvin, K. W., R. L. Eykholt, J. A. Keelan, T. A. Sato y M. D. Mitchell (2000). **"The 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2)receptor, peroxisome proliferator activated receptor-gamma (PPARgamma) is expressed in human gestational tissues and is functionally active in JEG3 choriocarcinoma cells."** *Placenta* **21**(4): 436-40.
- Maslar, I. A. y D. H. Riddick (1979). **"Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle."** *Am J Obstet Gynecol* **135**(6): 751-4.
- Meng, X., C. Chen, J. Qian, L. Cui y S. Wang (2023). **"Energy metabolism and maternal-fetal tolerance working in decidualization."** *Front Immunol* **14**: 1203719.
- Mikhailov, V. M. (2003). **"Life cycle of decidual cells."** *Int Rev Cytol* **227**: 1-63.
- Min, Y., C. Lowy, K. Ghebremeskel, B. Thomas, D. Bitsanis y M. A. Crawford (2005). **"Fetal erythrocyte membrane lipids modification: preliminary observation of an early sign of compromised insulin sensitivity in offspring of gestational diabetic women."** *Diabet Med* **22**(7): 914-20.
- Mirza, A. Z., Althagafi, II y H. Shamshad (2019). **"Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications."** *Eur J Med Chem* **166**: 502-513.

- Monsalve, M. y Y. Olmos (2011). **"The complex biology of FOXO."** *Curr Drug Targets* **12**(9): 1322-50.
- Monteiro, L. J., J. E. Norman, G. E. Rice y S. E. Illanes (2016). **"Fetal programming and gestational diabetes mellitus."** *Placenta* **48 Suppl 1**: S54-S60.
- Mor, G. y I. Cardenas (2010). **"The immune system in pregnancy: a unique complexity."** *Am J Reprod Immunol* **63**(6): 425-33.
- Moraes, L. A., L. Piqueras y D. Bishop-Bailey (2006). **"Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation."** *Pharmacol Ther* **110**(3): 371-85.
- Morales-Prieto, D. M., R. R. Favaro y U. R. Markert (2020). **"Placental miRNAs in feto-maternal communication mediated by extracellular vesicles."** *Placenta* **102**: 27-33.
- Mori, M., A. Bogdan, T. Balassa, T. Csabai y J. Szekeres-Bartho (2016). **"The decidua-the maternal bed embracing the embryo-maintains the pregnancy."** *Semin Immunopathol* **38**(6): 635-649.
- Mukumoto, S., K. Mori y H. Ishikawa (1995). **"Efficient induction of superovulation in adult rats by PMSG and hCG."** *Exp Anim* **44**(2): 111-8.
- Nagy, L., P. Tontonoz, J. G. Alvarez, H. Chen y R. M. Evans (1998). **"Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma."** *Cell* **93**(2): 229-40.
- Nainu, F., A. Frediansyah, S. S. Mamada, A. D. Permana, M. Salampe, D. Chandran, T. B. Emran y J. Simal-Gandara (2023). **"Natural products targeting inflammation-related metabolic disorders: A comprehensive review."** *Heliyon* **9**(6): e16919.
- Nardi Fda, S., T. F. Michelon, J. Neumann, L. F. Manvailer, B. Wagner, P. A. Horn, G. Bicalho Mda y V. Rebmann (2016). **"High levels of circulating extracellular vesicles with altered expression and function during pregnancy."** *Immunobiology* **221**(7): 753-60.
- Ng, S. W., G. A. Norwitz, M. Pavlicev, T. Tilburgs, C. Simon y E. R. Norwitz (2020). **"Endometrial Decidualization: The Primary Driver of Pregnancy Health."** *Int J Mol Sci* **21**(11).
- Nishimura, K., N. Yamauchi, V. S. Chowdhury, M. Torii, M. A. Hattori y M. Kaneto (2011). **"Expression of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms in the rat uterus during early pregnancy."** *Cell Tissue Res* **345**(2): 275-84.
- Noctor, E. y F. P. Dunne (2015). **"Type 2 diabetes after gestational diabetes: The influence of changing diagnostic criteria."** *World J Diabetes* **6**(2): 234-44.
- Nugent, B. M. y T. L. Bale (2015). **"The omniscient placenta: Metabolic and epigenetic regulation of fetal programming."** *Front Neuroendocrinol* **39**: 28-37.
- O'Neill, S., M. Bohl, S. Gregersen, K. Hermansen y L. O'Driscoll (2016). **"Blood-Based Biomarkers for Metabolic Syndrome."** *Trends Endocrinol Metab* **27**(6): 363-374.
- Ochiai, A., K. Kuroda, R. Ozaki, Y. Ikemoto, K. Murakami, J. Muter, A. Matsumoto, A. Itakura, J. J. Brosens y S. Takeda (2019). **"Resveratrol inhibits decidualization by accelerating downregulation of the CRABP2-RAR pathway in differentiating human endometrial stromal cells."** *Cell Death Dis* **10**(4): 276.
- Ohashi, K., N. Ouchi y Y. Matsuzawa (2012). **"Anti-inflammatory and anti-atherogenic properties of adiponectin."** *Biochimie* **94**(10): 2137-42.
- Ojeda, S. R., A. Lomniczi, U. Sandau y V. Matagne (2010). **"New concepts on the control of the onset of puberty."** *Endocr Dev* **17**: 44-51.
- Okada, H., T. Tsuzuki y H. Murata (2018). **"Decidualization of the human endometrium."** *Reprod Med Biol* **17**(3): 220-227.
- Ormandy, C. J., A. Camus, J. Barra, D. Damotte, B. Lucas, H. Buteau, M. Edery, N. Brousse, C. Babinet, N. Binart y P. A. Kelly (1997). **"Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse."** *Genes Dev* **11**(2): 167-78.
- Ou, X. H., C. C. Zhu y S. C. Sun (2019). **"Effects of obesity and diabetes on the epigenetic modification of mammalian gametes."** *J Cell Physiol* **234**(6): 7847-7855.
- Pal, A. K., S. Biswas, S. K. Goswami y S. N. Kabir (1999). **"Effect of pelvic endometrial implants on overall reproductive functions of female rats."** *Biol Reprod* **60**(4): 954-8.

- Pantham, P., I. L. Aye y T. L. Powell (2015). **"Inflammation in maternal obesity and gestational diabetes mellitus."** *Placenta* **36**(7): 709-15.
- Parr, M. B. y E. L. Parr (1986). **"Permeability of the primary decidual zone in the rat uterus: studies using fluorescein-labeled proteins and dextrans."** *Biol Reprod* **34**(2): 393-403.
- Paul, P., A. Chakraborty, D. Sarkar, M. Langthasa, M. Rahman, M. Bari, R. S. Singha, A. K. Malakar y S. Chakraborty (2018). **"Interplay between miRNAs and human diseases."** *J Cell Physiol* **233**(3): 2007-2018.
- Pawlak, M., P. Lefebvre y B. Staels (2015). **"Molecular mechanism of PPARalpha action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease."** *J Hepatol* **62**(3): 720-33.
- Peterson, T. R., M. Laplante, C. C. Thoreen, Y. Sancak, S. A. Kang, W. M. Kuehl, N. S. Gray y D. M. Sabatini (2009). **"DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival."** *Cell* **137**(5): 873-86.
- Piroddi, M., A. Albini, R. Fabiani, L. Giovannelli, C. Luceri, F. Natella, P. Rosignoli, T. Rossi, A. Taticchi, M. Servili y F. Galli (2017). **"Nutrigenomics of extra-virgin olive oil: A review."** *Biofactors* **43**(1): 17-41.
- 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.
- Portha, B., L. Picon y G. Rosselin (1979). **"Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes."** *Diabetologia* **17**(6): 371-7.
- Portius, D., C. Sobelowski y M. Foti (2017). **"MicroRNAs-dependent regulation of PPARs in metabolic disease and cancers."** *PPAR Res.*
- 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): 1082-90.
- Pustovrh, M. C., A. Jawerbaum, E. Capobianco, V. White, N. Martinez, J. J. Lopez-Costa y E. Gonzalez (2005). **"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): 1285-93.
- 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): 605-13.
- Qi, L., J. Jiang, P. Jin, M. Kuang, Q. Wei, F. Shi y D. Mao (2018). **"Expression patterns of claudin-5 and its related signals during luteal regression in pseudopregnant rats: The enhanced effect of additional PGF treatment."** *Acta Histochem* **120**(3): 221-227.
- Ramhorst, R., E. Grasso, D. Vota, S. Gori, V. Hauk, D. Paparini, G. Calo y C. Perez Leiros (2022). **"From decidualization to pregnancy progression: An overview of immune and metabolic effects of VIP."** *Am J Reprod Immunol* **88**(4): e13601.
- Ray, G. W., Q. Zeng, P. Kusi, H. Zhang, T. Shao, T. Yang, Y. Wei, M. Li, X. Che y R. Guo (2024). **"Genetic and inflammatory factors underlying gestational diabetes mellitus: a review."** *Front Endocrinol (Lausanne)* **15**: 1399694.
- Reese, J., N. Binart, N. Brown, W. G. Ma, B. C. Paria, S. K. Das, P. A. Kelly y S. K. Dey (2000). **"Implantation and decidualization defects in prolactin receptor (PRLR)-deficient mice are mediated by ovarian but not uterine PRLR."** *Endocrinology* **141**(5): 1872-81.
- Ren, J., Y. Ding, L. Yin, R. Qin, Y. She, J. Xu y Z. Wang (2018). **"[Effects of high-sucrose/high-fat diet feeding time on establishment of a mouse model of gestational diabetes mellitus]."** *Wei Sheng Yan Jiu* **47**(1): 128-133.
- Ricote, M. y C. K. Glass (2007). **"PPARs and molecular mechanisms of transrepression."** *Biochim Biophys Acta* **1771**(8): 926-35.
- Riskin-Mashiah, S., G. Younes, A. Damti y R. Auslender (2009). **"First-trimester fasting hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes."** *Diabetes Care* **32**(9): 1639-43.

- Roberti, S. L., C. R. Gatti, E. Capobianco, R. Higa y A. Jawerbaum (2023). **"Peroxisome proliferator-activated receptor pathways in diabetic rat decidua early after implantation: regulation by dietary polyunsaturated fatty acids."** Reprod Biomed Online **46**(4): 659-672.
- Roberti, S. L., C. R. Gatti, D. Fornes, R. Higa y A. Jawerbaum (2021). **"Diets enriched in PUFAs at an early postimplantation stage prevent embryo resorptions and impaired mTOR signaling in the decidua from diabetic rats."** J Nutr Biochem **95**: 108765.
- Roberti, S. L., R. Higa, H. Sato, D. Gomez Ribot, E. Capobianco y A. Jawerbaum (2020). **"Olive oil supplementation prevents extracellular matrix deposition and reduces prooxidant markers and apoptosis in the offspring s heart of diabetic rats."** Reprod Toxicol **95**: 137-147.
- Roberti, S. L., R. Higa, V. White, T. L. Powell, T. Jansson y A. Jawerbaum (2018). **"Critical role of mTOR, PPARGamma and PPARDelta signaling in regulating early pregnancy decidual function, embryo viability and feto-placental growth."** Mol Hum Reprod.
- Rodriguez-Cruz, M., R. S. Gonzalez, J. Maldonado, M. Lopez-Alarcon y M. Bernabe-Garcia (2016). **"The effect of gestational age on expression of genes involved in uptake, trafficking and synthesis of fatty acids in the rat placenta."** Gene **591**(2): 403-10.
- Rosario, F. J., M. B. Gupta, L. Myatt, T. L. Powell, J. P. Glenn, L. Cox y T. Jansson (2019). **"Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 Promotes the Expression of Genes Encoding Electron Transport Chain Proteins and Stimulates Oxidative Phosphorylation in Primary Human Trophoblast Cells by Regulating Mitochondrial Biogenesis."** Sci Rep **9**(1): 246.
- Rosario, F. J., N. Jansson, Y. Kanai, P. D. Prasad, T. L. Powell y T. Jansson (2011). **"Maternal protein restriction in the rat inhibits placental insulin, mTOR, and STAT3 signaling and down-regulates placental amino acid transporters."** Endocrinology **152**(3): 1119-29.
- Rovira, G., A. Jawerbaum, L. Glatstein, S. Sucani, C. Bertona, I. Argerich, C. Gomez Marti, M. Vivona, V. Kojdamanian, S. Gaitas, E. Capobianco, B. Parra, E. Rivas, M. Rodriguez, J. Alvariñas, S. Salzberg, M. Faingold, S. Lapertosa y N. Basualdo (2017). **"Recomendaciones para el manejo de las pacientes con diabetes pregestacional."** Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes **51**(4): 153-174.
- Ruszcza, M., A. Pilszyk, M. Niebrzydowska, Z. Kimber-Trojnar, M. Trojnar y B. Leszczynska-Gorzela (2022). **"Novel Biomolecules in the Pathogenesis of Gestational Diabetes Mellitus 2.0."** Int J Mol Sci **23**(8).
- Saeedi, M., Y. Cao, H. Fadl, H. Gustafson y D. Simmons (2021). **"Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus when implementing the IADPSG criteria: A systematic review and meta-analysis."** Diabetes Res Clin Pract **172**: 108642.
- Salomon, C. y G. E. Rice (2017). **"Role of Exosomes in Placental Homeostasis and Pregnancy Disorders."** Prog Mol Biol Transl Sci **145**: 163-179.
- Salomon, C., K. Scholz-Romero, S. Sarker, E. Sweeney, M. Kobayashi, P. Correa, S. Longo, G. Duncombe, M. D. Mitchell, G. E. Rice y S. E. Illanes (2016). **"Gestational Diabetes Mellitus Is Associated With Changes in the Concentration and Bioactivity of Placenta-Derived Exosomes in Maternal Circulation Across Gestation."** Diabetes **65**(3): 598-609.
- Salzberg, S., J. Alvariñas, G. López y e. al (2016). **"Guías de diagnóstico y tratamiento de diabetes gestacional. ALAD 2016."** Revista de la ALAD **6**: 155-169.
- Santa-Maria, C., S. Lopez-Enriquez, S. Montserrat-de la Paz, I. Geniz, M. E. Reyes-Quiroz, M. Moreno, F. Palomares, F. Sobrino y G. Alba (2023). **"Update on Anti-Inflammatory Molecular Mechanisms Induced by Oleic Acid."** Nutrients **15**(1).
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali, S. Sengupta, J. H. Sheen, P. P. Hsu, A. F. Bagley, A. L. Markhard y D. M. Sabatini (2006). **"Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB."** Mol Cell **22**(2): 159-68.
- Saxton, R. A. y D. M. Sabatini (2017). **"mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease."** Cell **169**(2): 361-371.

- Schaefer-Graf, U., A. Napoli, C. J. Nolan y G. Diabetic Pregnancy Study (2018). **"Diabetes in pregnancy: a new decade of challenges ahead."** *Diabetologia* **61**(5): 1012-1021.
- Scheuer, C. M., D. M. Jensen, H. D. McIntyre, L. Ringholm, E. R. Mathiesen, C. P. K. Nielsen, R. L. M. Nolsoe, J. Milbak, T. Hillig, P. Damm, M. Overgaard y T. D. Clausen (2023). **"Applying WHO2013 diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus reveals currently untreated women at increased risk."** *Acta Diabetol* **60**(12): 1663-1673.
- Selvin, E. y S. P. Juraschek (2020). **"Diabetes Epidemiology in the COVID-19 Pandemic."** *Diabetes Care* **43**(8): 1690-1694.
- Serradas, P., L. Goya, M. Lacorne, M. N. Gangnerau, S. Ramos, C. Alvarez, A. M. Pascual-Leone y B. Portha (2002). **"Fetal insulin-like growth factor-2 production is impaired in the GK rat model of type 2 diabetes."** *Diabetes* **51**(2): 392-7.
- Shah, K. B., S. D. Chernaused, A. M. Teague, D. E. Bard y J. B. Tryggestad (2021). **"Maternal diabetes alters microRNA expression in fetal exosomes, human umbilical vein endothelial cells and placenta."** *Pediatr Res* **89**(5): 1157-1163.
- Shamsad, A., A. S. Kushwah, R. Singh y M. Banerjee (2023). **"Pharmaco-epi-genetic and pathophysiology of gestational diabetes mellitus (GDM): An overview."** *Health Sciences Review* **7**: 100086.
- Sheiner, E., A. Kapur, R. Retnakaran, E. Hadar, L. C. Poon, H. D. McIntyre, H. Divakar, A. C. Staff, J. Narula, A. B. Kihara y M. Hod (2019). **"FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) Postpregnancy Initiative: Long-term Maternal Implications of Pregnancy Complications-Follow-up Considerations."** *Int J Gynaecol Obstet* **147** Suppl 1: 1-31.
- Simeoni, U. y D. J. Barker (2009). **"Offspring of diabetic pregnancy: long-term outcomes."** *Semin Fetal Neonatal Med* **14**(2): 119-24.
- Simmons, D., J. Immanuel, W. M. Hague, H. Teede, C. J. Nolan, M. J. Peek, J. R. Flack, M. McLean, V. Wong, E. Hibbert, A. Kautzky-Willer, J. Harreiter, H. Backman, E. Gianatti, A. Sweeting, V. Mohan, J. Enticott, N. W. Cheung y T. R. Group (2023). **"Treatment of Gestational Diabetes Mellitus Diagnosed Early in Pregnancy."** *N Engl J Med* **388**(23): 2132-2144.
- Song, W., Q. Li, L. Wang y L. Wang (2015). **"Modulation of FoxO1 expression by miR-21 to promote growth of pancreatic ductal adenocarcinoma."** *Cell Physiol Biochem* **35**(1): 184-90.
- Sotomaru, Y., T. Kamisako y K. Hioki (2005). **"Estrous stage- and animal age-independent superovulation in the Br/Han:WIST@Jcl(GALAS) rat."** *Exp Anim* **54**(2): 137-41.
- Stevenson, K., K. A. Lillycrop y M. J. Silver (2020). **"Fetal programming and epigenetics."** *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research* **1**: 13-16.
- Storch, J. y A. E. Thumser (2010). **"Tissue-specific functions in the fatty acid-binding protein family."** *J Biol Chem* **285**(43): 32679-32683.
- Sugrue, R. y C. Zera (2018). **"Pregestational Diabetes in Pregnancy."** *Obstet Gynecol Clin North Am* **45**(2): 315-331.
- Suh, J. H., K. H. Kim, M. E. Conner, D. D. Moore y G. A. Preidis (2022). **"Hepatic PPARalpha Is Destabilized by SIRT1 Deacetylase in Undernourished Male Mice."** *Front Nutr* **9**: 831879.
- Sweeting, A., J. Wong, H. R. Murphy y G. P. Ross (2022). **"A Clinical Update on Gestational Diabetes Mellitus."** *Endocr Rev* **43**(5): 763-793.
- Sweeting, A. N., G. P. Ross, J. Hyett, L. Molyneaux, M. Constantino, A. J. Harding y J. Wong (2016). **"Gestational Diabetes Mellitus in Early Pregnancy: Evidence for Poor Pregnancy Outcomes Despite Treatment."** *Diabetes Care* **39**(1): 75-81.
- Szkudelski, T. (2001). **"The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas."** *Physiol Res* **50**(6): 537-46.
- Szmulowicz, E. D., J. L. Josefson y B. E. Metzger (2019). **"Gestational Diabetes Mellitus."** *Endocrinol Metab Clin North Am* **48**(3): 479-493.

- Takada, I. y M. Makishima (2020). **"Peroxisome proliferator-activated receptor agonists and antagonists: a patent review (2014-present)."** *Expert Opin Ther Pat* **30**(1): 1-13.
- Tam, W. H., R. C. W. Ma, R. Ozaki, A. M. Li, M. H. M. Chan, L. Y. Yuen, T. T. H. Lao, X. Yang, C. S. Ho, G. E. Tutino y J. C. N. Chan (2017). **"In Utero Exposure to Maternal Hyperglycemia Increases Childhood Cardiometabolic Risk in Offspring."** *Diabetes Care* **40**(5): 679-686.
- Tan, N. S., N. S. Shaw, N. Vinckenbosch, P. Liu, R. Yasmin, B. Desvergne, W. Wahli y N. Noy (2002). **"Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription."** *Mol Cell Biol* **22**(14): 5114-27.
- Taqi, B., F. Asadi, E. Capobianco, D. B. Hardy, A. Jawerbaum y E. J. Arany (2020). **"Addition of olive oil to diet of rats with mild pre-gestational diabetes impacts offspring beta-cell development."** *J Endocrinol* **246**(2): 175-187.
- Thaweethai, T., Z. Soetan, K. James, J. C. Florez y C. E. Powe (2023). **"Distinct Insulin Physiology Trajectories in Euglycemic Pregnancy and Gestational Diabetes Mellitus."** *Diabetes Care* **46**(12): 2137-2146.
- Tian, Z., Z. A. Zhao, X. H. Liang, X. H. Zhang, A. G. Sha, Z. R. Zhang, Y. S. Yu y Z. M. Yang (2011). **"Expression and function of fatty acid-binding protein 4 during mouse decidualization."** *Fertil Steril* **95**(8): 2749-52 e1-5.
- Treiber, T., N. Treiber y G. Meister (2019). **"Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways."** *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**(1): 5-20.
- Tryggestad, J. B., A. M. Teague, D. P. Sparling, S. Jiang y S. D. Chernauek (2019). **"Macrophage-Derived microRNA-155 Increases in Obesity and Influences Adipocyte Metabolism by Targeting Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma."** *Obesity (Silver Spring)* **27**(11): 1856-1864.
- Valsamakis, G., D. Papatheodorou, Z. Papadimitriou, G. Landis, E. Kapantais y A. Thomopoulos (2014). **"Dietary carbohydrates predict maternal hyperinsulinaemia and cord blood visfatin levels in pregnancy compared to total daily caloric intake, fat and proteins."** *Diabetologia* **57**: S315.
- Vambergue, A. y I. Fajardy (2011). **"Consequences of gestational and pregestational diabetes on placental function and birth weight."** *World J Diabetes* **2**(11): 196-203.
- Wahli, W. y L. Michalik (2012). **"PPARs at the crossroads of lipid signaling and inflammation."** *Trends Endocrinol Metab* **23**(7): 351-63.
- Wang, H., H. Xie, X. Sun, S. Tranguch, H. Zhang, X. Jia, D. Wang, S. K. Das, B. Desvergne, W. Wahli, R. N. DuBois y S. K. Dey (2007a). **"Stage-specific integration of maternal and embryonic peroxisome proliferator-activated receptor delta signaling is critical to pregnancy success."** *J Biol Chem* **282**(52): 37770-82.
- Wang, L., T. E. Harris, R. A. Roth y J. C. Lawrence, Jr. (2007b). **"PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding."** *J Biol Chem* **282**(27): 20036-44.
- 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): 661-71.
- Wang, Y., J. Chen, W. Tang, Y. Zhang y X. Li (2017). **"Rapamycin inhibits the proliferation of endothelial cells in hemangioma by blocking the mTOR-FABP4 pathway."** *Biomed Pharmacother* **85**: 272-279.
- Wang, Y., J. Liu, H. Wang, S. Lv, Q. Liu, S. Li, X. Yang y G. Liu (2023). **"Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Ameliorate Diabetic Kidney Disease Through the NLRP3 Signaling Pathway."** *Stem Cells* **41**(4): 368-383.
- Wen, Z. H., Y. C. Su, P. L. Lai, Y. Zhang, Y. F. Xu, A. Zhao, G. Y. Yao, C. H. Jia, J. Lin, S. Xu, L. Wang, X. K. Wang, A. L. Liu, Y. Jiang, Y. F. Dai y X. C. Bai (2013). **"Critical role of arachidonic acid-activated mTOR signaling in breast carcinogenesis and angiogenesis."** *Oncogene* **32**(2): 160-70.

- Westwood, F. R. (2008). **"The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging."** *Toxicol Pathol* **36**(3): 375-84.
- 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.*
- 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.
- Wieser, F., L. Waite, C. Depoix y R. N. Taylor (2008). **"PPAR Action in Human Placental Development and Pregnancy and Its Complications."** *PPAR Res* **2008**: 527048.
- Wongwarawipat, T., N. Papageorgiou, D. Bertias, G. Siasos y D. Tousoulis (2018). **"Olive Oil-related Anti-inflammatory Effects on Atherosclerosis: Potential Clinical Implications."** *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* **18**(1): 51-62.
- Wood, G. A., J. E. Fata, K. L. Watson y R. Khokha (2007). **"Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus."** *Reproduction* **133**(5): 1035-44.
- Xia, H. F., J. L. Cao, X. H. Jin y X. Ma (2014). **"MiR199a is implicated in embryo implantation by regulating Grb10 in rat."** *Reproduction* **147**(1): 91-9.
- Xiong, B., Y. Cheng, L. Ma y C. Zhang (2013). **"MiR-21 regulates biological behavior through the PTEN/PI-3 K/Akt signaling pathway in human colorectal cancer cells."** *Int J Oncol* **42**(1): 219-28.
- 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): 13919-24.
- Xu, W., A. San Lucas, Z. Wang y Y. Liu (2014). **"Identifying microRNA targets in different gene regions."** *BMC Bioinformatics* **15 Suppl 7**(Suppl 7): S4.
- Xu, Y., Q. Wang, T. J. Cook y G. T. Knipp (2007). **"Effect of placental fatty acid metabolism and regulation by peroxisome proliferator activated receptor on pregnancy and fetal outcomes."** *J Pharm Sci* **96**(10): 2582-606.
- Yan, Q., G. Yan, C. Zhang, Z. Wang, C. Huang, J. Wang, J. Zhou, Y. Liu, L. Ding, Q. Zhang, X. Zhen, Y. Jiang y H. Sun (2019). **"miR-21 reverses impaired decidualization through modulation of KLF12 and NR4A1 expression in human endometrial stromal cellsdagger."** *Biol Reprod* **100**(5): 1395-1405.
- Yang, N., Y. Sun, B. Han, N. Deng, G. Li, Q. Han, Y. Wang, H. Cai, F. Liu, B. Cao, W. Deng, H. Bao, S. Kong, J. Lu y H. Wang (2024). **"Trophoblastic signals facilitate endometrial interferon response and lipid metabolism, ensuring normal decidualization."** *Cell Rep* **43**(6): 114246.
- Yarlagadda, A., G. Acharya, J. Kasaraneni, C. S. Hampe y A. H. Clayton (2019). **"Placental Barrier and Autism Spectrum Disorders: The Roles of Prolactin and Dopamine in the Developing Fetal Brain-Part II."** *Innov Clin Neurosci* **16**(11-12): 36-39.
- Yonezawa, K., C. Tokunaga, N. Oshiro y K. Yoshino (2004). **"Raptor, a binding partner of target of rapamycin."** *Biochem Biophys Res Commun* **313**(2): 437-41.
- Yoshikawa, T., Z. Brkanac, B. R. Dupont, G. Q. Xing, R. J. Leach y S. D. Detera-Wadleigh (1996). **"Assignment of the human nuclear hormone receptor, NUC1 (PPARD), to chromosome 6p21.1-p21.2."** *Genomics* **35**(3): 637-8.
- Yu, J., S. L. Berga, W. Zou, A. Rajakumar, M. Man, N. Sidell y R. N. Taylor (2020). **"Human Endometrial Stromal Cell Differentiation is Stimulated by PPARbeta/delta Activation: New Targets for Infertility?"** *J Clin Endocrinol Metab* **105**(9).
- Yun, J. S. y S. H. Ko (2021). **"Current trends in epidemiology of cardiovascular disease and cardiovascular risk management in type 2 diabetes."** *Metabolism* **123**: 154838.

- Zhai, J., L. Ma, Z. Chang y T. Yu (2022). **"Increased expression of prokineticin 2 and its receptor in endometrium of recurrent implantation failure patients decreased the expression of MMP9 important for decidualization."** Reprod Biol Endocrinol **20**(1): 76.
- Zhang, S., H. Lin, S. Kong, S. Wang, H. Wang, H. Wang y D. R. Armant (2013). **"Physiological and molecular determinants of embryo implantation."** Mol Aspects Med **34**(5): 939-80.
- Zhang, X., L. J. Fu, X. Q. Liu, Z. Y. Hu, Y. Jiang, R. F. Gao, Q. Feng, X. Lan, Y. Q. Geng, X. M. Chen, J. L. He, Y. X. Wang y Y. B. Ding (2016). **"nm23 regulates decidualization through the PI3K-Akt-mTOR signaling pathways in mice and humans."** Hum Reprod **31**(10): 2339-51.
- Zhang, Y. F., H. M. Xu, F. Yu, M. Wang, M. Y. Li, T. Xu, Y. Y. Gao, J. X. Wang y P. F. Li (2018). **"Crosstalk between MicroRNAs and Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Their Emerging Regulatory Roles in Cardiovascular Pathophysiology."** PPAR Res **2018**: 8530371.
- Zhou, Y., H. Qiao, L. Liu, P. Dong, F. Zhu, J. Zhang, L. Liu y L. Liu (2021). **"miR-21 regulates osteogenic and adipogenic differentiation of BMSCs by targeting PTEN."** J Musculoskelet Neuronal Interact **21**(4): 568-576.
- Zhu, Q., Y. Jin, P. Wang, H. Wang, B. Lu, Z. Wang y M. Dong (2015). **"Expression and function of fatty acid-binding protein 4 in epithelial cell of uterine endometrium."** Cell Biol Int **39**(5): 540-7.
- Zinger, M., M. McFarland y N. Ben-Jonathan (2003). **"Prolactin expression and secretion by human breast glandular and adipose tissue explants."** J Clin Endocrinol Metab **88**(2): 689-96.