

Tesis Doctoral

Mecanismos de inducción y de prevención de malformaciones congénitas en la patología diabética: rol de agonistas de PPARs y ácido fólico

Higa, Romina Daniela

2011

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

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

Cita tipo APA:

Higa, Romina Daniela. (2011). Mecanismos de inducción y de prevención de malformaciones congénitas en la patología diabética: rol de agonistas de PPARs y ácido fólico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Higa, Romina Daniela. "Mecanismos de inducción y de prevención de malformaciones congénitas en la patología diabética: rol de agonistas de PPARs y ácido fólico". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Mecanismos de inducción y de prevención de malformaciones
congénitas en la patología diabética:
Rol de agonistas de PPARs y ácido fólico**

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

Autor: Romina Daniela Higa
Director de tesis: Dra. Alicia Jawerbaum
Consejero de estudios: Dra. Laura López

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

Buenos Aires, 11 de Abril de 2011

Mecanismos de inducción y de prevención de malformaciones
congénitas en la patología diabética:
Rol de agonistas de PPARs y ácido fólico

En este trabajo se estudiaron las anomalías inducidas por la diabetes materna en el embrión y en la decidua de rata en el período de organogénesis temprana, así como también el efecto de la administración de agonistas de receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) administrados en la dieta y/o de ácido fólico sobre dichas anomalías.

Se encontró una disminución en el crecimiento embrionario y un incremento en las tasas de reabsorción y malformación embrionaria en las ratas diabéticas y se observaron disminuciones en los niveles de PPAR δ tanto en los embriones como en las deciduas provenientes de ratas diabéticas. Además, se observaron en estos tejidos alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico, en la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y en la actividad y expresión de enzimas responsables de la remodelación tisular inducidas por la diabetes.

Las dietas suplementadas con aceites ricos en agonistas de PPARs administradas a las ratas diabéticas gestantes revierten parcialmente las anomalías en el crecimiento embrionario y la tasa de malformación embrionaria. El mecanismo de acción involucra la regulación de la producción de prostaglandinas, la reducción del estrés oxidativo y nitrativo y la regulación de la actividad de las MMPs y TIMPs en el embrión y en la decidua diabética. El tratamiento consistente en la administración de ácido fólico junto a la dieta enriquecida en aceite de cártamo administrado a las ratas diabéticas logra una reversión total de las malformaciones embrionarias regulando el entorno pro-inflamatorio inducido por la diabetes y previniendo anomalías de enzimas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular tanto en el embrión como en la decidua de rata diabética.

Estos hallazgos nos permiten destacar a los tratamientos enriquecidos en aceites de oliva y cártamo (capaces de activar PPARs) y con folatos como eficaces reguladores del daño inducido por la diabetes materna, resultados de interés en la búsqueda de tratamientos plausibles de ser aplicados a la gestación humana.

Palabras clave: malformaciones embrionarias, diabetes, PPARs, ácido fólico, prostaglandinas, especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, metaloproteasas de matriz extracelular.

Mechanism of induction and prevention of diabetes-induced
congenital malformations:
Role of PPARs agonist and folic acid

In this study we evaluated maternal diabetes-induced anomalies in the rat embryo and decidua at early organogenesis as well as the effect of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) agonists administered in the diet and/or folic acid on these anomalies.

We found a decrease in embryo growth and an increase in resorption and malformation rates in diabetic rats. Also, PPAR δ was found diminished in embryos and decidua from diabetic rats. These intrauterine tissues showed diabetes-induced alterations in arachidonic acid metabolism, in reactive oxygen and nitrogen species and in the expression and activities of enzymes involved in tissue remodeling.

Diets supplemented with PPAR agonists administered to diabetic pregnant rats partially reversed the abnormalities in embryonic growth and embryonic malformation rate. The mechanism of action involves the regulation of prostaglandin production, of nitrate and oxidative stress and of MMPs and TIMPs activities in the embryo and decidua from diabetic rats. Folic acid administered together with the safflower oil-supplemented diet achieved a complete reversal of embryonic malformations, possibly by regulating the pro-inflammatory environment induced by diabetes and by preventing alterations in extracellular matrix remodeling enzymes both in the embryo and decidua from diabetic rats.

These findings allow us to highlight olive and safflower oil dietary treatments (capable of PPAR activation) and folates as effective regulators of the intrauterine damage induced by maternal diabetes during early organogenesis, results of interest in the search for treatments to be applied to human diabetic pregnancies.

Key words: embryonic malformations, diabetes, PPARs, folic acid, prostaglandins, reactive oxygen and nitrogen species, matrix metalloproteinases.

El contenido de esta tesis ha sido parcialmente publicado en:

Safflower-oil and olive-oil dietary treatments rescues aberrant embryonic arachidonic acid and nitric oxide metabolism, and prevents diabetic embryopathy in rats. Higa R, White V, Martinez N, Kurtz M, Capobianco E, Jawerbaum A. *Molecular Human Reproduction* 16:286-295 (2010).

PPAR δ and its activator PGI $_2$ are reduced in diabetic embryopathy: involvement of PPAR δ activation in lipid metabolic and signalling pathways in rat embryo early organogenesis. Higa R, González E, Pustovrh C, White V, Capobianco E, Martínez N, Jawerbaum A. *Molecular Human Reproduction* 13(2):103-10 (2007).

A Daniel y Lara



Agradecimientos

Quisiera agradecer profundamente a quienes de una manera u otra colaboraron en la realización de esta tesis:

A la Dra Alicia Jawerbaum por su compromiso, dedicación y responsabilidad en la dirección de esta tesis, también por su confianza y sus consejos guiándome en el camino de la ciencia.

A la Dra Éida González porque sus enseñanzas siempre formarán parte de nuestro laboratorio.

A mis compañeras del laboratorio, Evangelina, Verónica, Carolina, Nora, Melisa y Belén por las correcciones de la tesis, su apoyo constante y por compartir mucho más que experimentos haciendo que sea lindo el día a día.

A mis compañeras del piso 17 por toda su ayuda y buena predisposición de siempre.

Al Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos por brindarme un lugar para formarme en la carrera científica y a todos los integrantes de esta institución que colaboraron en el desarrollo de esta tesis.

Al CONICET y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales por su apoyo económico y académico.

A todos mis amigos por estar siempre presentes y a mi familia por valorar mi trabajo apoyándome incondicionalmente, especialmente a Atsu, Miriam y Vicky.

A Daniel que con su amor, paciencia y constante apoyo me acompañó siempre tanto desde lo profesional como personal y a Larita, por ser el sol que me ilumina día a día.



Indice

Introducción	1
Desarrollo embrionario y decidual	1
Desarrollo embrionario	1
Proceso de decidualización	6
La patología diabética	10
Diabetes tipo I	11
Diabetes tipo II	12
Diabetes gestacional	14
Modelos experimentales de diabetes	15
Adaptaciones del metabolismo materno a la gestación e impacto de la diabetes materna	16
Prostanoides	21
Estructura y función biológica de los prostanoides	21
Prostanoides en los procesos reproductivos fisiológicos e impacto de la diabetes mellitus	26
Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno	28
Las especies reactivas del oxígeno	28
Función biológica de las especies reactivas del oxígeno	30
El óxido nítrico	31
Función biológica del óxido nítrico	32
Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la patología diabética	34
Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en procesos reproductivos fisiológicos e impacto de la diabetes	36
Las metaloproteasas de la matriz extracelular	39
Participación de las MMPs en los procesos reproductivos fisiológicos y patológicos	45
Desregulación de las MMPs en la patología diabética	46
Los inhibidores tisulares de las metaloproteasas	48
Participación de los TIMPs en los procesos reproductivos fisiológicos y patológicos	54
PPARs-Receptores activados por proliferadores peroxisomales	55
Función biológica de los PPARs	58
Participación de los PPARs en los procesos reproductivos	63

PPARs en la gestación diabética	65
Ácido Fólico	68
Metabolismo del ácido fólico	68
Participación del ácido fólico en la patología diabética	71
Hipótesis y Objetivos	73
Hipótesis general	73
Hipótesis de trabajo	74
Objetivos específicos	75
Materiales y Métodos	77
Materiales	77
Equipos de determinación colorimétrica	77
Sales	77
Solventes	77
Drogas y reactivos	77
Anticuerpos	78
Otros	79
Programas de análisis de imágenes	79
Programas de análisis estadísticos	79
Métodos	80
Modelo experimental de diabetes	80
Apareos	80
Tratamientos <i>in vivo</i> con agonistas dietarios de PPARs	80
Tratamientos <i>in vivo</i> con ácido fólico	81
Obtención de embriones y deciduas	82
Morfología embrionaria	82
Determinación de proteínas	83
Niveles de PGI ₂	83
Niveles de PGE ₂	83
Niveles de TXA ₂	84
Niveles de peroxidación lipídica (TBARS)	85
Niveles de isoprostanos	85
Cuantificación de nitratos/nitritos	86
Detección de la actividad de las MMPs	86
Detección de la actividad inhibitoria de las MMPs por TIMPs	87
Western Blot de PPARs y TIMPs	88
Inmunolocalización de MMPs, TIMPs y residuos de nitrotirosina	90
Estudio de la tasa MMPs/TIMPs mediante zimografía <i>in situ</i>	91
Determinaciones estadísticas	92

Resultados	93
Capítulo I: Anomalías inducidas por la diabetes en el embrión y la decidua de rata en el período de organogénesis temprana	93
Glucemia materna, parámetros de crecimiento embrionario, tasa de reabsorción y malformación embrionaria	94
Niveles de PPARs en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	95
Niveles de PGI ₂ en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	97
Niveles de PGE ₂ en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	99
Niveles de TXA ₂ en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	100
Producción de óxido nítrico en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	101
Niveles de peroxidación lipídica en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	102
Inmunolocalización de residuos de nitrotirosina en el embrión y la decidua de rata control y diabética en período de organogénesis temprana	104
Actividad de las MMPs en el embrión y la decidua de rata control y diabética en período de organogénesis temprana	106
Detección de MMP9 en el embrión y la decidua de rata control y diabética en período de organogénesis temprana	109
Detección de MMP2 en el embrión y la decidua de rata control y diabética en período de organogénesis temprana	110
Actividad de los TIMPs en el embrión y la decidua de rata control y diabética en período de organogénesis temprana	112
Niveles de TIMPs en el embrión y la decidua de rata control y diabética en período de organogénesis temprana	115
Balance MMP/TIMPs <i>in situ</i> en el embrión y la decidua de rata en período de organogénesis temprana	119
Capítulo II: Efecto de la suplementación dietaria con agonistas de PPARs a ratas controles y diabéticas gestantes sobre el embrión y la decidua en el período de organogénesis temprana	122
Glucemia e ingesta materna, parámetros de crecimiento embrionario y tasa de reabsorción y malformación embrionaria en ratas controles y diabéticas en etapa de organogénesis temprana	123
Niveles de PGI ₂ en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	125
Niveles de PGE ₂ en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	128
Producción de óxido nítrico en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	130

Niveles de peroxidación lipídica en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	132
Actividad de las MMPs en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	134
Actividad de los inhibidores tisulares de las MMPs en el embrión y la decidua de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	140
Capítulo III: Efecto del tratamiento <i>in vivo</i> con ácido fólico y agonistas de PPARs a ratas controles y diabéticas gestantes sobre el embrión y la decidua en el período de organogénesis temprana	145
Glucemia, parámetros de crecimiento embrionario y tasa de reabsorción y malformación embrionaria en ratas sanas y diabéticas en etapa de organogénesis temprana	145
Producción de óxido nítrico en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	148
Niveles de peroxidación lipídica en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	150
Actividad de las MMPs en el embrión y la decidua de rata control y diabética en período de organogénesis temprana	153
Actividad de los inhibidores tisulares de las MMPs en el embrión y la decidua de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	159
Balance MMPs/TIMPs <i>in situ</i> en el embrión y la decidua de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana	164
Discusión	168
Conclusiones	190
Bibliografía	194



Abreviaturas

PPARs: Receptores activados por proliferadores peroxisomales

PGs: Prostaglandinas

TXA₂: Tromboxano A₂

COX: Ciclooxygenasa

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

KRB: Medio krebs ringer bicarbonato

MEC: Matriz extracelular

MMPs: Metaloproteinasas de matriz

NO: Óxido nítrico

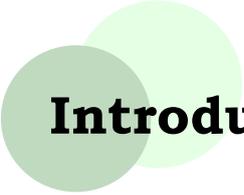
NOS: Óxido nítrico sintasa

PBS: Buffer fosfato salino

ROS: Especies reactivas del oxígeno

TIMPs: Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas

Demás abreviaturas son indicadas en el texto



Introducción

Desarrollo embrionario y decidual

Desarrollo embrionario

La vida de un nuevo organismo se inicia con la fusión del material genético de las gametas sexuales, el espermatozoide y el ovocito, en un evento denominado fecundación que ocurre en la ámpula del oviducto.

Luego de la fecundación, comienza el desarrollo embrionario y, posteriormente al establecimiento de la placenta, el desarrollo fetal. El desarrollo embrionario comprende varias etapas: clivaje, gastrulación y organogénesis.

Durante el clivaje se suceden una serie de rápidas divisiones mitóticas donde el citoplasma del cigoto es dividido en numerosas células más pequeñas denominadas blastómeros, originando la mórula (estadio de 16 células) (Gilbert 2000). En los mamíferos, durante el clivaje ocurre el fenómeno de compactación en donde las células de la mórula maximizan sus contactos mediante uniones estrechas. La mórula consiste en un pequeño grupo de células internas rodeadas de un grupo de células externas, éstas últimas originarán las células del trofoblasto y no darán lugar a estructuras embrionarias sino que originarán el corion, la parte embrionaria de la placenta (Gilbert 2000). Por otro lado, las células internas generarán el macizo celular interno que originará el embrión, el saco vitelino, el alantoides y el amnion.

Posteriormente sucede el proceso de cavitación donde las células del trofoblasto secretan fluido dentro de la mórula originando, de esta manera, el blastocele (Gilbert 2000). Esta estructura se denomina blastocisto.

Durante la implantación del blastocisto, el trofoblasto invade el endometrio penetrándolo hasta quedar inmerso en la pared uterina; en este punto el embrión es bilaminar, y está formado por el epiblasto o ectodermo primario y el hipoblasto o endodermo primario. El epiblasto comienza a coleccionar fluido y se forma una nueva cavidad denominada cavidad amniótica que se llena de una secreción denominada fluido amniótico que preserva al embrión de la desecación; algunas células del epiblasto se diferencian a amnioblastos que formarán la membrana amniótica (Gilbert 2000). Células del hipoblasto se transforman en endodermo extraembrionario y sufren dos corrientes de migración, la primera recubre la cavidad del blastocisto dando origen al saco vitelino primario, la segunda corriente transforma al saco vitelino primario en el saco vitelino definitivo (Cross y col. 1994) (Figura 1).

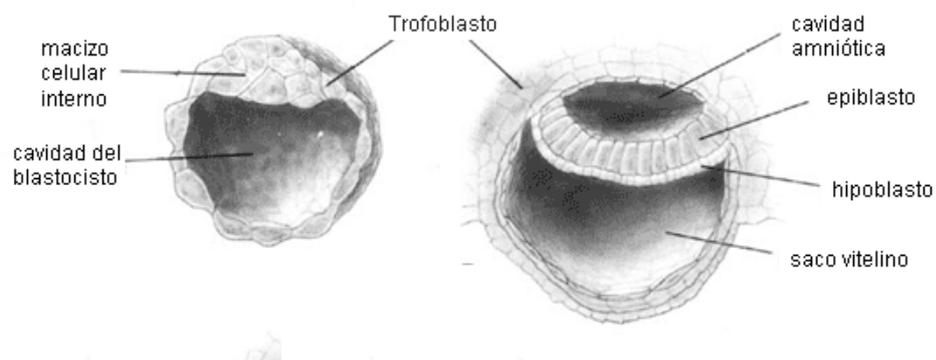


Figura 1. Esquema de blastocisto.

Con la aparición de la línea primitiva en el epiblasto del embrión bilaminar comienza el proceso de gastrulación mediante el cual se inician movimientos celulares y tisulares para establecer la estructura corporal del organismo (formación de capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo) que dará origen al embrión trilaminar. El mesodermo y endodermo migran a través de la línea primitiva y las células que ingresan a través del nodo de Hensen originarán la notocorda (Gilbert 2000).

También se establecen en este momento el eje ántero-posterior mediante la expresión de los genes homeóticos. El eje dorso-ventral se establece en el blastocisto, donde el eje dorsal se originaría en las células del macizo celular interno en contacto con el trofoblasto y la polaridad dorso-ventral es mantenida por la notocorda induciendo patrones

específicos de expresión génica en el tubo neural. La distinción entre izquierda derecha comienza con el movimiento ciliar de las células ciliares del nodo que activa factores parácrinos (Nodal y Lefty-2) en el mesodermo del lateral izquierdo embrionario (Gilbert 2000).

Cada uno de los tejidos primarios formados durante la gastrulación (endodermo, mesodermo y ectodermo) experimenta crecimiento y diferenciación, dando lugar al comienzo del proceso de organogénesis que llevará al desarrollo de la mayoría de los principales órganos y regiones corporales (Figura 2).

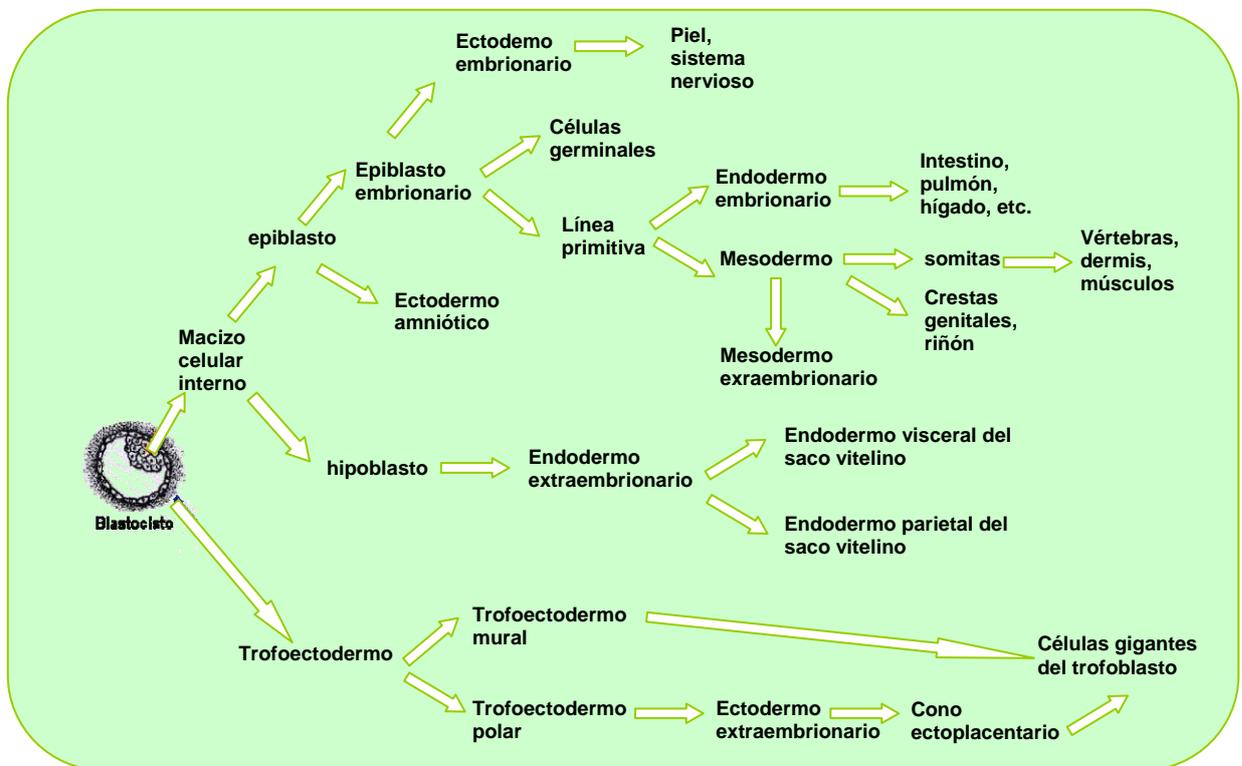


Figura 2. Linajes celulares y tisulares del embrión. Esquema modificado de Carlson 2000.

Durante la organogénesis temprana comienza el desarrollo de los principales órganos y sistemas, se segmenta el mesodermo, se forman los arcos branquiales y comienzan a migrar las células de la cresta neural.

El primer órgano funcional que aparece durante el desarrollo embrionario es el corazón. Se origina de dos regiones del mesodermo esplácnico que interactúan con el tejido adyacente. En mamíferos, las

células que darán origen al corazón forman dos tubos endocardiales que se fusionan ventralmente al tubo endodérmico que constituirá el tubo digestivo. La fusión de los tubos endocardiales forma un único compartimiento, se genera así una cámara que tiene actividad pulsátil aún antes de asumir su función como bombeadora de sangre. La actividad pulsátil del corazón comienza antes de que éste adquiriera su conformación definitiva y este latido cardíaco es índice de viabilidad en esta etapa del desarrollo embrionario (Gilbert 2000). El mesodermo esplácnico, recubre el endotelio cardíaco del tubo endocardial fusionado y se diferencia en una parte externa llamada miocardio, la cual separándose del endotelio, secreta una masa acelular de matriz. El conjunto de miocardio, matriz y endocardio se denomina corazón primitivo (Kaufmann 1999). En la región cefálica del mismo se originarán los arcos aórticos y en la región caudal los senos venosos que recibirán las venas vitelinas. Estas venas serán las que transporten los nutrientes desde el saco vitelino a la aurícula primitiva, pasando posteriormente al ventrículo primitivo para luego ser transportados a la aorta gracias a las contracciones ventriculares (Kaufmann 1999). La función temprana del corazón aún cuando no está totalmente formado, obedece a las necesidades embrionarias de nutrición, transporte y excreción. A medida que la masa celular aumenta y las estructuras se complejizan, la difusión a través del saco vitelino no es suficiente y el embrión requiere de una estructura capaz de satisfacer sus necesidades cada vez mayores, la placenta.

Asimismo, en el período de organogénesis temprana aparecen las somitas, constituidas por células mesodérmicas ubicadas a cada lado de la notocorda que se compactan y separan en bloques. Éstas originarán las vértebras, costillas, dermis dorsal, músculos esqueléticos de la espalda y músculos esqueléticos de la pared del cuerpo y miembros.

Otro evento fundamental en la organogénesis temprana es la neurulación o formación del tubo neural que originará el sistema nervioso central (Figura 3). En las primeras etapas de este proceso, el mesodermo que originará la notocorda induce al ectodermo que lo recubre a proliferar (formación de placa neural), invaginarse (originando el surco neural) y formar un tubo hueco (tubo neural); que permanecerá abierto en los extremos (aberturas denominadas neuroporo anterior y posterior) durante

mayor tiempo, denominándose al proceso de cierre de los mismos neurulación secundaria.

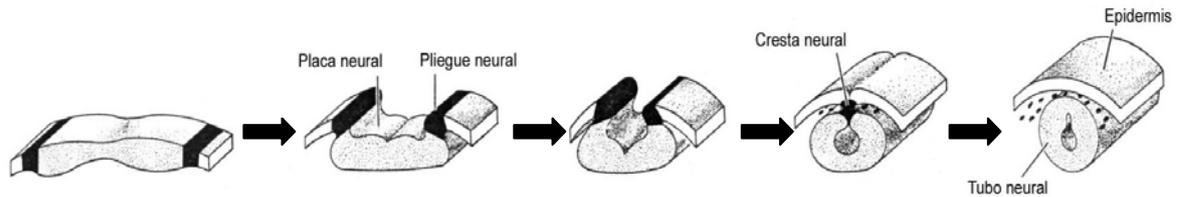


Figura 3. Representación de la formación del tubo neural. Esquema adaptado de Kaufmann 1999.

El ectodermo se diferenciará en tres grupos celulares: las células internas del tubo neural que originarán el cerebro y la médula, las células externas del tubo neural que originarán la epidermis y las células de la cresta neural ubicadas entre las otras dos que migrarán y originarán diferentes órganos y estructuras (Carlson 2000). Las células de la cresta neural originarán a los huesos y cartílagos de la cara y del oído medio, a los ganglios simpáticos y parasimpáticos, al tejido conectivo del sistema circulatorio y a los melanocitos (Carlson 2000).

En el tubo neural se distinguen inmediatamente dos partes fundamentales; la porción anterior del tubo neural, parte superior más voluminosa situada en la cabeza del embrión y de la que derivará el encéfalo; y la porción medular del tubo neural, parte más estrecha y alargada, situada en el tronco del embrión y de la que derivará la médula espinal.

La primera evidencia de las tres subdivisiones del cerebro primitivo es la distribución del lumen neural en tres vesículas, el prosencéfalo, mesencéfalo y el rombencéfalo.

Dado que la organogénesis es el período de mayor susceptibilidad a la inducción de malformaciones congénitas, existen claros parámetros de clasificación basados en la morfología externa del embrión y que permiten identificar su correcto desarrollo y las consecuencias de su exposición a diversas moléculas, teratógenos o entornos patológicos (Brown 1991).

En el día 10.5 de gestación en la rata, correspondiente al período de organogénesis temprana, puede observarse, mediante una lupa, la cresta neural, el grado de cierre del tubo neural, el primordio cardíaco y su latido y

las somitas a cada lado de la notocorda. En esta etapa se produce la rotación del embrión respecto a su eje axial (Figura 4). El intestino que inicialmente se encuentra orientado hacia el trofoblasto, acorde a la nutrición que se efectúa a través del saco vitelino, será rodeado por células de origen embrionario luego de la rotación y en una etapa previa a consolidarse la funcionalidad placentaria (Kaufmann 1999).

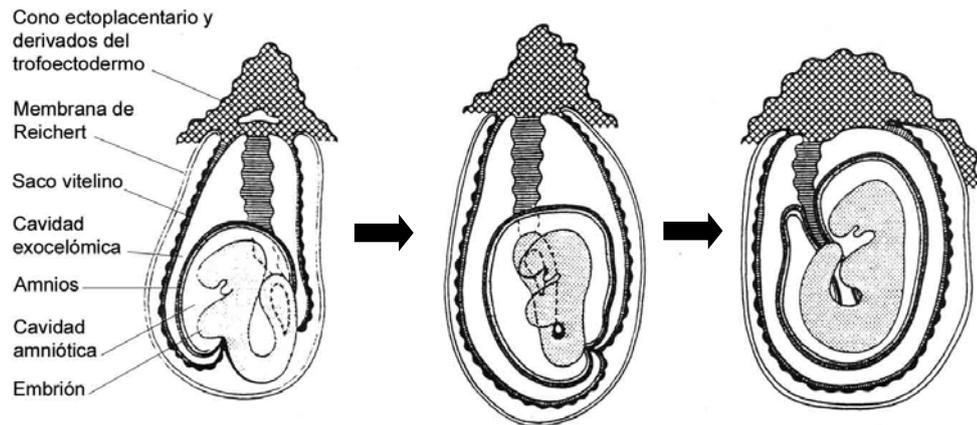


Figura 4. Proceso de rotación embrionaria esquema modificado de Kaufmann 1999.

Una vez que la placenta definitiva está establecida, culmina la etapa de organogénesis y comienza una nueva etapa, la etapa fetal. En este período la mayoría de los órganos adquieren su conformación, estructura y función definitiva (Gumbiner 1992; Kaufmann 1999).

Proceso de decidualización

La implantación es un conjunto de eventos complejos que comienza luego de la fecundación y finaliza cuando el blastocisto se encuentra embebido en el estroma endometrial.

La implantación en roedores se acompaña de marcados cambios en el endometrio, que consisten en modificaciones en la forma, organización y metabolismo de las células del tejido conectivo endometrial, dando lugar a la formación de un tejido diferente, la decidua.

La decidualización comienza alrededor de las criptas mucosas donde se implanta el embrión, es decir que inicialmente se forma la decidua antimesometrial (denominada decidua capsularis en humanos), llamada de esta manera en roedores por ser la zona de la decidua más cercana al mesometrio (Figura 5), ligamento que conecta el útero con la pared abdominal y que contiene a la arteria uterina (Abrahamsohn y Zorn 1993). Las células deciduales se forman por la transformación de las células fibroblásticas estromales, en las mismas se observa un incremento de su tamaño, adoptan una forma redondeada o poligonal, reorganizan su nucleolo y disminuyen el espacio extracelular (Abrahamsohn y Zorn 1993). A nivel estructural, el citoplasma se enriquece en retículo endoplasmático rugoso, complejo de Golgi y mitocondrias, acumulan lípidos, glucógeno y filamentos intermedios y establecen uniones intercelulares entre sí (Welsh y Enders 1985; Blankenship y col. 1990; Abrahamsohn y Zorn 1993).

La primer capa decidualizada que aparece durante la implantación, es la que rodea al embrión y se denomina decidua primaria. Las células que rodean a la decidua primaria se denominan células deciduales maduras y, a medida que nos distanciamos del embrión, la morfología celular es un intermedio entre las células deciduales maduras y los fibroblastos y se denominan células predeciduales (Abrahamsohn y Zorn 1993) (Figura 5).

De forma interesante, la zona decidual primaria no posee vasculatura y se postula que actuaría como una barrera al pasaje de macromoléculas protegiendo, de esta manera al embrión de micoorganismos, IgG materna y células del sistema inmune (Parr y Parr 1986).

La decidualización es un proceso más lento en la zona mesometrial del endometrio, estas células están más espaciadas entre sí y sus organelas también están menos desarrolladas en relación a la zona antimesometrial (Abrahamsohn y Zorn 1993). La decidua mesometrial es la denominada decidua basal en humanos. Existe una región intermedia entre la zona mesometrial y antimesometrial que es rica en glucógeno, posee características morfológicas similares a la zona antimesometrial y posee un laberinto de vasos sanguíneos (Abrahamsohn y Zorn 1993).

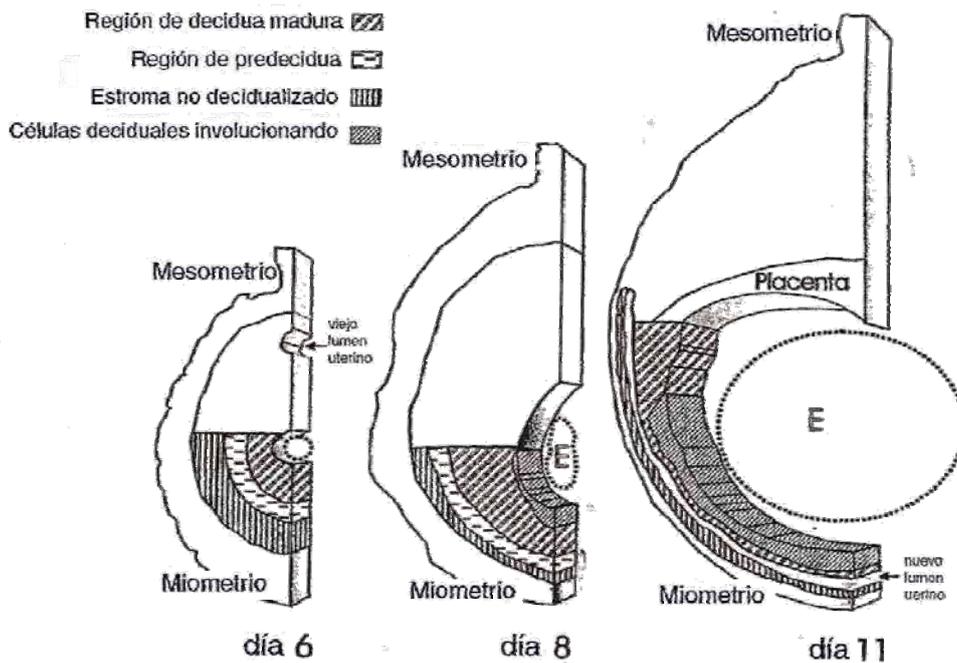


Figura 5. Crecimiento e involución de la decidua de ratón. Esquema adaptado de Abrahamsohn 2002. Los días 6, 8 y 11 en ratón equivalen a 7.5, 9.5 y 12.5 en la rata.

Existen además otros tipos celulares en la decidua de rata, las denominadas inicialmente células granuladas de la glandula metrial, que luego fueron llamadas células natural killer uterinas (NKu) y más recientemente se realizó una distinción entre las células NK que se encuentran en el endometrio y las que se encuentran en la decidua, éstas últimas denominadas células natural killer deciduales (NKd) (Croy y col. 2003; Yagel 2009). Aunque su origen no es claro, se postula que podrían llegar a la decidua desde otro órgano como la médula ósea, que se diferenciarían de células madre de las NKd, que se diferenciarían de las NK endometriales o bien que provendrían de las tres fuentes (Yagel 2009). Pueden producir quimioquinas, factores de crecimiento y factores angiogénicos y se sugiere que tendrían un rol en el control de la diferenciación, crecimiento e invasión del trofoblasto, siendo estas funciones importantes para una correcta angiogénesis de la placenta (Croy y col. 1991; Yagel 2009). Además, podrían eliminar células trofoblásticas de migración anormal y tendrían un rol en la tolerancia materna de los tejidos fetales (Parr y col. 1990).

Algunas de las funciones de la decidua incluyen la nutrición del embrión, la restricción de la invasión del trofoblasto y la participación en la respuesta inmunológica materna a la preñez. Entre los mediadores involucrados en estas funciones, se ha reportado que la decidua secreta prostaglandinas (Parr y col. 1988), IGFBP-1 (Croze y col. 1990), TGF- α (Han y col. 1987), TNF- α (Yelavarthi y col. 1991), GM-CSF (Crainie y col. 1990), colágeno tipo IV y laminina (Wewer y col. 1986; Glasser y col. 1987). Además, expresa entre otros, el receptor de insulina, el receptor para el factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-1) y el receptor de glucocorticoides (Korgun y col. 2003).

Las prostaglandinas tienen un rol clave en la inducción de la decidualización. Se ha observado que la indometacina, un inhibidor de la biosíntesis de PGs, inhibe la inducción de reacción decidual inducida artificialmente (Kennedy y col. 2007). Actualmente se sabe que la PGI₂ actuando a través del receptor nuclear PPAR δ activa la decidualización en ratones (Lim y col. 1999) y que es la PGE₂ la que inicia la decidualización en el endometrio de ratas, observando que la misma es responsable de la permeabilidad vascular endometrial que se induce en las etapas tempranas del proceso de decidualización (Gillio-Meina y col. 2009).

Al ser el proceso de decidualización una transformación del tejido conectivo, es esperable que existan transformaciones en su matriz extracelular. En efecto, en ratones, antes de la implantación, la matriz extracelular que rodea a las células del estroma endometrial se compone de colágeno I, III, V y VI y fibronectina, y durante la decidualización se remueve el colágeno VI y las células deciduales producen desmina y componentes de la membrana basal como laminina, entactina y colágeno tipo IV (Glasser y col. 1987; Spiess y Zorn 2007).

Durante la implantación, el trofoblasto del embrión de ratón produce metaloproteasas de matriz que pueden ayudar a la digestión de la membrana basal de las células deciduales y el tejido decidual libera inhibidores tisulares de MMPs que inhiben la actividad de dichas metaloproteasas (Reponen y col. 1995; Alexander y col. 1996).

A medida que crece el embrión, se observa que el tamaño de la decidua ya no se incrementa debido a que, de forma simultánea a la decidualización, se va desarrollando un proceso de involución de la decidua.

Tanto el proceso de decidualización como el de involución decidua ocurren paralelamente de manera centrífuga respecto al embrión. Esta involución puede atribuirse a un tipo de muerte celular programada (Welsh y Enders 1985; Katz y Abrahamsohn 1987). Los restos celulares son fagocitados por las células gigantes del trofoblasto (Katz y Abrahamsohn 1987) y el espacio es ocupado por el embrión en crecimiento. Este podría ser un mecanismo de control de la decidua al avance trofoblástico. Para el día 16 de preñez en la rata, la decidua antimesometrial se convierte en una fina capa compuesta mayoritariamente de células deciduales muertas (Welsh y Enders 1985).

Además, paralelamente al proceso de involución decidua ocurre la invasión trofoblástica de la decidua mesometrial para dar origen a la placenta. En roedores, son las células derivadas del trofoectodermo polar que componen el cono ectoplacentario las que se diferenciarán, se asociarán con células de origen alantoideo y formarán la placenta; mientras que los trofoblastos derivados del trofoectodermo mural se diferenciarán en células gigantes del trofoblasto (Cross 1998).

Al día 12 de preñez en la rata, tres zonas, fisiológica y anatómicamente diferentes, pueden ser visualizadas en la placenta: la zona del laberinto, que está compuesta por cordones de células del trofoblasto embrionario bañados por sangre materna, la zona de unión, constituida por espongiotrofoblastos (derivados del cono ectoplacentario) la cual es limitada por una capa discontinua de células gigantes del trofoblasto que aíslan al embrión de la decidua materna.

La patología diabética

La diabetes mellitus es una patología crónica cuya prevalencia se incrementa año a año estimándose que para el año 2030 afectará al 4,4% de la población mundial (Wild y col. 2004). El trastorno de la regulación metabólica que acompaña a la diabetes provoca alteraciones fisiopatológicas secundarias en muchos sistemas orgánicos, y ocasiona

importantes consecuencias económicas y sociales en los pacientes, sus familiares y los sistemas de salud de cada país.

Existen diferentes tipos de diabetes mellitus y diferentes etapas en las que esta patología se induce debido a una compleja interacción entre la genética del individuo, factores ambientales y el estilo de vida.

A largo plazo, la diabetes se asocia a disfunción e insuficiencia de diversos órganos, ocasionando serias complicaciones como ser: la retinopatía diabética, la insuficiencia renal, la neuropatía diabética, alteraciones cardiovasculares y accidentes cerebro-vasculares, siendo en definitiva éstas las causas de la incrementada morbimortalidad presente en esta patología (Conget 2002).

Dependiendo del tipo de diabetes, los factores que contribuyen a la hiperglucemia pueden ser un descenso en la secreción de la insulina, de la sensibilidad de la misma, o de ambas (Conget 2002). La hiperglucemia induce la producción de altos niveles de especies reactivas del oxígeno en detrimento de la capacidad antioxidante, alteraciones nocivas para los tejidos (Giacco y Brownlee 2010). Por otro lado, la hipoinsulinemia impide la utilización de la glucosa como fuente energética en tejidos insulino-dependientes, implica una disminución de la tasa anabólica y un incremento en los procesos catabólicos que utilizan lípidos como sustrato, en detrimento de los procesos adipogénicos y glucogenogénicos. El déficit de insulina y/o sus fallas de acción producen, por un lado, un incremento de la glucemia debido a la reducida incorporación de glucosa a los tejidos y órganos blanco, y a la falta de freno del proceso de gluconeogénesis hepática (Efendic y col. 1985), y por otro, un aumento en la lipólisis y en los niveles de ácidos grasos circulantes y un incremento en la tasa de oxidación de los mismos (Bonadonna y De Fronzo 1991; McGarry 2002).

Diabetes tipo 1

La diabetes mellitus tipo 1 se origina por un proceso autoinmune que destruye las células beta pancreáticas, pudiendo encontrarse auto-anticuerpos en el 85-90% de los pacientes en los que se detecta

hiperglucemia por primera vez. Este tipo de diabetes se presenta en un 10-15 % del total de los pacientes diabéticos.

El proceso se inicia frecuentemente luego de una infección viral que altera las células β pancreáticas de forma tal que son reconocidas como extrañas por el sistema inmune.

Es una enfermedad de etiología multifactorial, ya que están implicados la susceptibilidad genética, algún factor desencadenante y una respuesta inmune determinada. Se caracteriza por aparecer generalmente antes de los 30 años de edad y más del 50% de los casos se diagnostica en edad pediátrica, teniendo un inicio relativamente brusco que necesita rápidamente de la utilización de insulina. Los pacientes presentan una sintomatología clásica resultado de la insulinopenia e hiperglucemia, caracterizada por: poliuria, polidipsia, polifagia (llamativa porque por lo general cursa con pérdida de peso).

El 80-85% de los pacientes que padece esta patología presenta algún marcador serológico en forma de autoanticuerpos, como ser anticuerpo anti-islole pancreático (ICA), anticuerpos anti-insulina (AAI), anticuerpos anti-decarboxilasa del ácido glutámico (anti-GAD) y anticuerpos anti-tirosinofosfatasa (anti-IA 2) (Srikanta y col. 1986; Villalba y col. 2008). En los pacientes que padecen esta patología se origina una insulinodependencia parcial que se vuelve absoluta con el paso del tiempo por lo cual el tratamiento de los mismos es la administración de insulina y debe ser iniciado apenas el diagnóstico es confirmado. Sin embargo, las dosis de insulina empleadas dependerán de los requerimientos individuales

Diabetes tipo 2

Es el tipo más prevalente de diabetes. Se produce como resultado de mecanismos de resistencia a la insulina asociados con defectos en la secreción de esta hormona. La insulino resistencia se caracteriza por diversas alteraciones vinculadas con la unión de la insulina a su receptor, la función del receptor de insulina y defectos en los mecanismos de producción de la hormona, a su vez relacionados con la cantidad y/o la eficiencia de los receptores de glucosa en el páncreas endócrino (Unger y

Grundy 1985; Comi y col. 1987; Brillon y col. 1989). Esta patología solía afectar a individuos adultos, sin embargo actualmente también se diagnostica en jóvenes, adolescentes y niños correlacionándose con el incremento de la prevalencia de la obesidad en estas edades (Dabelea y col. 1998; Klein y col. 2004).

En la etiología de la diabetes de tipo 2 el principal factor determinante es el ambiental, marcado por los cambios en el estilo de vida ocurridos en el último siglo, tales como malos hábitos alimenticios junto al sedentarismo, que conducen al aumento del índice de masa corporal. Además, otro factor ambiental que en los últimos años ha comenzado a considerarse muy importante dada la mayor incidencia de la diabetes gestacional e intolerancia a la glucosa en la gestación, es la programación intrauterina. En efecto, la diabetes materna es capaz de inducir alteraciones en la función pancreática y en el eje endócrino fetal, aumentando la predisposición a padecer diabetes tipo 2, hipertensión, obesidad y diferentes enfermedades cardiovasculares en algún momento de la vida postnatal (Aerts y Van Assche 2003).

La diabetes tipo 2 representa un grave problema socio-sanitario y económico, que adquirió características epidemiológicas, sobre todo en países occidentales. No existen marcadores específicos para esta patología. Sin embargo, debe considerarse la historia familiar de diabetes tipo 2, ya que generalmente hay varios miembros de la misma familia afectados en diferentes generaciones (Hannon y col. 2005). La presentación clínica de la misma suele ser muy variada, puede cursar con la sintomatología típica de la hiperglucemia o puede ser prácticamente asintomática. Desafortunadamente, una gran cantidad de casos son diagnosticados en forma tardía por la ausencia de síntomas cuando ya son evidentes las lesiones propias de la enfermedad crónica.

El tratamiento inicial para este tipo de diabetes es generalmente dietario y de estilo de vida, en muchos de los casos necesitarán posteriormente tratamientos farmacológicos como aquellos que estimulan la secreción pancreática de insulina o incrementan la sensibilidad de la respuesta insulínica e incluso muchas veces se requiere la administración de insulina.

Diabetes gestacional

Se denomina diabetes gestacional cuando la diabetes se detecta por primera vez en el embarazo. La insulino resistencia es fisiológica durante la gestación dado el incremento de la adiposidad materna y el redireccionamiento del metabolismo materno por parte de las hormonas placentarias (Barbour y col. 2007). Este fenómeno es de vital importancia para el feto en desarrollo, ya que incrementa la disponibilidad de glucosa y los tejidos fetales utilizan este sustrato como el combustible de elección. Normalmente las células β -pancreáticas incrementan la secreción de insulina para compensar la insulino resistencia propia de la gestación, lo cual implica una sobreexigencia para el páncreas endócrino de la mujer gestante. La diabetes gestacional se induce cuando se produce una insuficiente secreción de insulina por parte del páncreas, incapaz de cubrir las demandas del organismo (Kautzky-Willer y col. 1997).

La incidencia de esta patología se ha duplicado en menos de 10 años y crece en paralelo con la epidemia de la obesidad (WHO 2003). Esta patología tiene implicancias a largo plazo ya que a pesar de que las mujeres revierten el estado de diabetes luego del parto, eleva el riesgo de desarrollo de diabetes tipo 2 en la madre y de obesidad e intolerancia a la glucosa en la descendencia (Van Assche y col. 2001; Aerts y Van Assche 2003). Si bien, dada la definición, la diabetes gestacional incluye a aquellas mujeres cuya diabetes era preexistente pero no había sido identificada antes de la gestación, en la mayoría de los casos la intolerancia a la glucosa se produce hacia fines del segundo trimestre de embarazo, cuando es mayor el requerimiento insulínico materno y se presentan fallas en el páncreas materno para responder en forma adecuada a dicho cambio. Dado que en estos últimos casos, el inicio de la enfermedad es posterior al período de organogénesis embrionaria, la diabetes gestacional no incrementa el riesgo de malformación congénita, a diferencia de lo que ocurre en la diabetes pre-gestacional donde se incrementa entre 2 y 8 veces el riesgo de malformaciones embrionarias. Sin embargo, tanto en la diabetes gestacional como pre-gestacional, las anomalías metabólicas que ocurren afectan la transferencia de nutrientes materno-fetal, y condicionan un mayor crecimiento y adiposidad fetal, relacionados con la programación intra-

uterina de diversas patologías que incluyen la intolerancia a la glucosa y obesidad (Catalano y Kirwan 2001). Además, generan un entorno proinflamatorio que condiciona el desarrollo del feto y de la placenta, y que se vincula con la alterada programación intrauterina que condicionará la vida adulta del neonato (Radaelli y col. 2003).

Las mujeres diabéticas gestacionales muestran diferentes niveles de hiperglucemia e intolerancia a la glucosa, y pueden requerir una intervención terapéutica limitada a la dieta o bien la administración de insulina (Freinkel y col. 1985). Además, las mujeres diabéticas tipo 2 que utilizaban hipoglucemiantes orales deberán utilizar insulina durante su embarazo, habiéndose también comenzado a emplearse en forma reciente ciertas drogas como la metformina durante la gestación (Simmons 2010).

Modelos experimentales de diabetes

Diferentes modelos de diabetes experimental han sido desarrollados para el estudio de la patología diabética y pueden utilizarse para el estudio de la diabetes en la gestación (Jawerbaum y White 2010). Los más utilizados son aquellos obtenidos en rata y ratón por la administración de drogas como aloxano o estreptozotocina; también pueden utilizarse cepas que desarrollan la patología espontáneamente o por manipulación genética (Jawerbaum y White 2010).

La inducción química de la patología ha sido ampliamente utilizada por diversos grupos de trabajo. La estreptozotocina es un antibiótico que se obtiene del *Streptomyces Acharamogenes* e induce la muerte específica de las células β pancreáticas (Rakieten y col. 1963). La estreptozotocina presenta en su estructura química una 2-deoxi glucosa en su cadena lateral, que dada su similitud con la glucosa, le permite, a las dosis empleadas, unirse de manera específica y con alta afinidad a los receptores de glucosa en las células β pancreáticas. Una vez dentro de la célula, la droga produce la metilación del ADN causando ruptura y alquilación de su estructura, e induciendo a la enzima reparadora del ADN, la poliADP-ribosa-sintasa, a reparar dicha molécula. Esta enzima utiliza como cofactor el NAD^+ , la depleción de este compuesto en forma conjunta con la

sobreproducción de agentes oxidativos y nitrosativos, lleva a la muerte de las células β pancreáticas (Junod y col. 1967; Orci y col. 1968).

Para generar un modelo experimental de diabetes severa (valores de glucemia >250 mg/dl), se administra la estreptozotocina a la rata adulta, lo cual ocasiona la destrucción del páncreas endocrino. Este modelo presenta muchas de las características de los pacientes con diabetes tipo 1 no controlada, tales como hiperglucemia severa, marcada hipoinsulinemia, pérdida de peso, cetoacidosis, polifagia, polidipsia y poliuria, y en las hembras, profundas fallas en el mantenimiento del ciclo estral luego de los 10-15 días posteriores a la administración de la droga (Junod y col. 1967). La incrementada tasa de malformaciones embrionarias observadas en este modelo experimental facilita el estudio del mecanismo de inducción de las mismas (Jawerbaum y col. 2000; Jawerbaum y White 2010).

Se puede generar un modelo murino de diabetes moderada (valores de glucemia entre 150 y 250 mg/dl) administrándose estreptozotocina por vía subcutánea en el neonato (Portha y col. 1979). Esta metodología se basa en la capacidad del páncreas neonatal de recuperarse parcialmente por regeneración de células indiferenciadas que aún se conservan a las 24-48 horas de vida post-natal. Se obtienen animales adultos que cursan una diabetes moderada, presentando hiperglucemias que oscilan entre 150 y 250 mg/dl, insulinemia ligeramente disminuida y ausencia de cetoacidosis (Portha y col. 1979). Este modelo presenta niveles de glucemia semejantes a aquellos frecuentemente encontrados en pacientes diabéticos, aún bajo tratamiento insulínico. El mismo es compatible con la preñez a término por lo cual permite evaluar el desarrollo fetal y placentario a lo largo de la gestación diabética (Jawerbaum y White 2010).

Adaptaciones del metabolismo materno a la gestación e impacto de la diabetes materna

Durante la gestación, el desarrollo fetal depende de la disponibilidad de nutrientes que provienen de la circulación materna transportados a través de la placenta. El metabolismo materno se modifica para asegurar un continuo aporte de nutrientes al feto en desarrollo, a pesar de la

intermitente ingesta de alimentos por parte de la madre (Freinkel 1980). Las hormonas producidas durante la gestación son: gonadotrofina coriónica humana, lactógeno placentaria, prolactina, progesterona, estrógenos y cortisol; éstas juegan un papel muy importante en la regulación de estos cambios metabólicos.

Durante los primeros dos tercios de la gestación, la madre acumula una cantidad importante de nutrientes, principalmente como depósitos de grasa (Lopez-Luna y col. 1986) como resultado del desarrollo de hiperinsulinemia y sensibilidad normal o aumentada a la insulina en combinación con la hiperfagia y el limitado crecimiento fetal de esta etapa, generándose un estado anabólico (Buch y col. 1986; Ramos y col. 2003). Durante el último tercio de la gestación, el metabolismo de la madre cambia de la condición anabólica previa, a una condición catabólica en términos del aumento de la lipólisis en el tejido adiposo, facilitado por el desarrollo de una condición insulino-resistente (Cousins 1991). En este período de la gestación la madre tiende a desarrollar hipoglucemia, a pesar de presentar un incremento en la gluconeogénesis y una menor utilización de este carbohidrato por parte de los tejidos maternos en respuesta a la insulino resistencia. Esta hipoglucemia es el resultado de una elevada tasa de transferencia de glucosa hacia el feto dado que la misma es el principal sustrato oxidable que utiliza el feto (Herrera y col. 1985).

El aumento de la producción de progesterona durante la primer parte de la gestación es en parte responsable de la hiperinsulinemia, la hiperfagia, la hipertrofia de los islotes pancreáticos, el incremento de depósitos de lípidos en tejido adiposo y de la disminución de la síntesis de glucógeno en adipocitos y músculo. Hacia fines de la gestación prepara las glándulas mamarias para la lactancia (Kalkhoff 1982). Por otro lado, la producción incrementada de estrógenos durante la gestación activa las vías de síntesis de glucosa e inhibe las enzimas limitantes del ciclo de los ácidos tricarboxílicos a nivel hepático (Diamant y col. 1975).

Las hormonas hCG y lactógeno placentario son producidas por la placenta, la primera tiene efectos sobre el metabolismo placentario, estimulando la glucogenolisis y glucólisis en este tejido, sin embargo su principal función es la de regular la producción hormonal (Demers y col. 1973; Diamant y col. 1975; Ryan y Enns 1988). La hormona lactógeno

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

Dado que la patología diabética presenta insulino resistencia, hiperglucemia e hiperlipidemia, durante la gestación diabética ocurre una exacerbación de las características metabólicas propias del embarazo generada por la resistencia insulínica fisiológica producto de las hormonas de la preñez. La insulino resistencia de los tejidos periféricos aumenta la demanda de insulina y en muchos casos el tratamiento con insulina se suma al tratamiento dietario para contrarrestar la hiperglucemia y la hiperlipidemia. Hacia el final de la gestación se favorecen los mecanismos de producción de cetonas y oxidación de lípidos, por lo tanto, si la insulina no es suficiente podrá producirse cetoacidosis, peligrosa para la gestante y el feto en desarrollo. Además, la patología diabética durante la gestación altera la producción hormonal, lo que complica aún más el cuadro diabético (Tesone y col. 1983; Camus-Bablon y col. 1990).

La diabetes en el embarazo induce anomalías en el desarrollo embrionario, observándose incrementos en los índices de abortos espontáneos, anomalías congénitas, patologías perinatales como distrés respiratorio e hipoglucemia neonatal entre otras, como así también patologías que serán evidentes en la adolescencia o en la etapa adulta de la descendencia (Kitzmilller y col. 1978; Mills y col. 1979; Martinez-Frias y col. 1998; Simeoni y Barker 2009).

En embriones pre-implantatorios, la hiperglucemia provoca alteraciones en el transporte de glucosa y un incremento en la apoptosis de células del blastocisto, particularmente en las localizadas en la masa celular interna, que darán origen al embrión (Moley 2001; Chi y col. 2002; Jungheim y Moley 2008). En estos embriones se observa también retraso de crecimiento y menor viabilidad en cultivo (Diamond y col. 1989; Vercheval y col. 1990; Moley y col. 1991).

La mayoría de las malformaciones que se inducen en la patología diabética ocurren en la fase crítica de organogénesis (en el humano antes de la 7^{ma} semana de gestación y en la rata antes del día 13.5 de gestación)

(Eriksson y col. 1989). Las principales malformaciones observadas tanto en el humano como en modelos experimentales de diabetes son el resultado de alteraciones en el desarrollo cardíaco y durante el cierre del tubo neural, que desencadena patologías como el tronco arterioso persistente, defectos septo-ventriculares, espina bífida, diversos grados de anencefalia, holoprosencefalia, así como otras alteraciones en el desarrollo y función del sistema nervioso central (Farrell y col. 2002; Wren y col. 2003; Molin y col. 2004; Dheen y col. 2009). Asimismo, son importantes las fallas en el sistema urinario, en el desarrollo pulmonar, en la formación de la mandíbula y maxilar y otras dismorfogénesis del esqueleto (Mills y col. 1979; Singh y Feigelson 1983; Martinez-Frias y col. 1998).

En cuanto a los mecanismos involucrados en inducción de malformaciones, se conoce que la hiperglucemia, la cetonemia, el incremento en aminoácidos ramificados en suero y la trigliceridemia en la gestación diabética inducen alteraciones metabólicas y en los sistemas de señalización celular (Buchanan y col. 1994; Styruud y col. 1995) dando lugar a anomalías en el metabolismo del inositol (precursor de fosfatidilinositol y diacilglicerol) (Sussman y Matschinsky 1988), a incrementos en la activación de la vía de los polioles (en la cual la glucosa es metabolizada a sorbitol) (Hod y col. 1986), a alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico (Piddington y col. 1996; Jawerbaum y Gonzalez 2005) y a incrementos en la formación de especies reactivas del oxígeno (Eriksson y col. 1991; Eriksson y Borg 1993; King y Loeken 2004; Eriksson 2009).

En efecto, se observa estrés oxidativo a nivel embrionario inducido por la diabetes materna (Ornoy 2007) relacionado con una inhibición en la expresión del gen Pax3 que induce alteraciones en la migración de células de la cresta neural generando anomalías en el cono de salida ventricular, habiéndose observado también que alteraciones en la expresión de Pax3 se relacionan con los defectos de tubo neural inducidos por la diabetes (Fine y col. 1999; Morgan y col. 2008). En forma consecuente, se evidencia un incremento de la apoptosis en el embrión durante la etapa de organogénesis temprana (Fine y col. 1999; Gareskog y col. 2007).

Si bien el período de organogénesis temprana es el de mayor susceptibilidad a la inducción de malformaciones congénitas, las anomalías inducidas por la diabetes luego de la placentación son también relevantes

ya que dan lugar a alteraciones que estarán vinculadas a anomalías de desarrollo fetal y neonatal. Dichas anomalías, como el distrés respiratorio fetal y la macrosomía, podrán comprometer el desarrollo de órganos como el páncreas, riñones, pulmones y corazón, dando origen a enfermedades que se presentarán en la vida adulta del hijo de madre diabética (Aerts y Van Assche 2003). Los daños generados por la hiperglucemia materna también están presentes en la placenta y afectan tanto su estructura morfológica como su función, condicionando, de acuerdo a la severidad de dicho daño, alteraciones que comprometerán el crecimiento y desarrollo del feto (Shafrir y Barash 1991; Leach y col. 2009). Dichas alteraciones pueden dar lugar a la restricción del crecimiento fetal en los casos en que se generan condiciones hipóxicas y de menor perfusión (Eriksson y Jansson 1984), mientras que se genera macrosomía en aquellos casos en que existe un mayor transporte de nutrientes a través de la placenta, debido a los mayores niveles de metabolitos circulantes en la madre, y al límite que posee la placenta para acumular los sustratos de origen materno que se proveen en exceso (Jansson y col. 2006).

A pesar del avance en el cuidado de la gestante con diabetes, las malformaciones embrionarias inducidas por la diabetes materna prevalecen en esta patología dadas las dificultades en el estricto control metabólico a través de la dieta y la administración de insulina durante la gestación (Yang y col. 2006). Resta mucho aún por aclarar sobre los mecanismos que, debido a las alteraciones metabólicas maternas, inducen daño embrionario a nivel morfológico y de desarrollo, constituyendo lo que se denomina **“embriopatía diabética”**. El estudio de los mecanismos que participan en la inducción de la embriopatía diabética nos permitirá el desarrollo de nuevas terapéuticas para el tratamiento de dichas malformaciones.

Prostanoides

Estructura y función biológica de los prostanoides

Los prostanoides (prostaglandinas y tromboxanos) comprenden una gran familia de lípidos biológicamente activos derivados de ácidos grasos poliinsaturados de 20 carbonos en donde la inserción del oxígeno produce la formación de un anillo (Figura 6).

Las prostaglandinas (PGs) se clasifican en base a los sustituyentes del anillo pentano (PGs A, B, C, D, E, F, G, H e I) y también en base al número de dobles enlaces en las cadenas laterales (A1, A2, E1, E2, etc.).

Se conocen tres familias principales de PGs naturales de acuerdo a la cantidad de dobles enlaces que poseen en sus cadenas laterales y al sustrato utilizado para su síntesis, las prostaglandinas de la serie 1, 2 y 3, utilizan el ácido dihomo- γ -linolénico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico respectivamente (Figura 6).

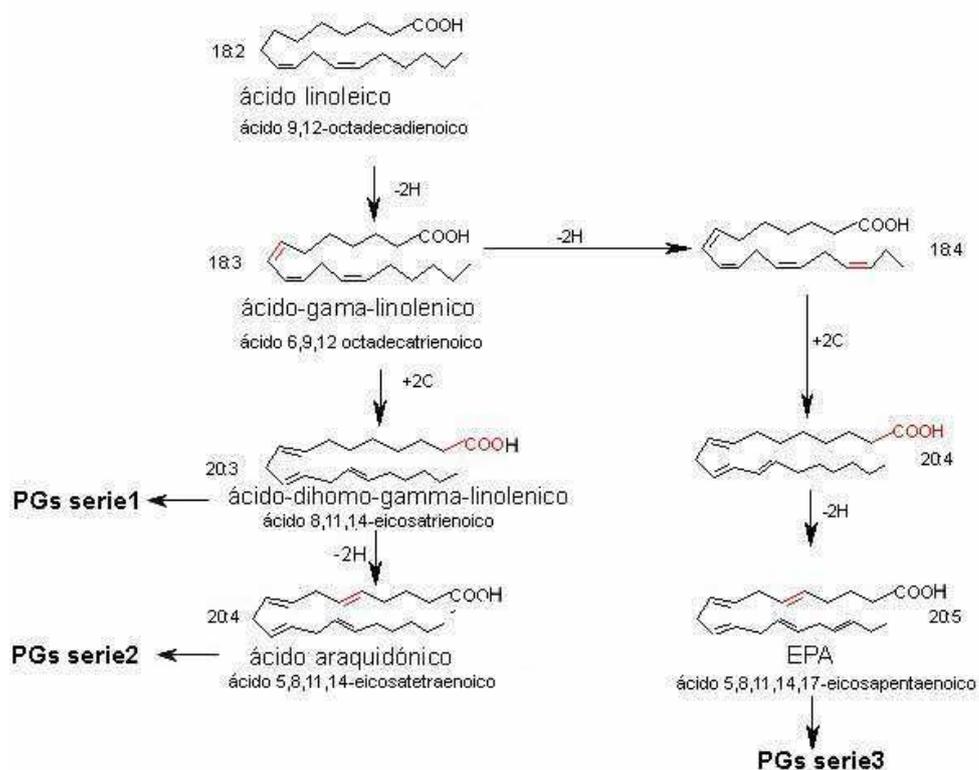


Figura 6. Esquema de las diferentes series de PGs.

En particular, el ácido araquidónico es liberado a partir de fosfolípidos de membrana principalmente a través de la acción de la enzima fosfolipasa A₂ (Kudo y Murakami 2002). El ácido araquidónico, considerado un ácido graso esencial, proviene de la dieta o por desaturación y elongación del ácido linoleico, también un ácido graso esencial que no puede ser sintetizado por los mamíferos (Smith 1989).

Las enzimas que catalizan la formación de las prostaglandinas son las ciclooxigenasas (COXs) o prostaglandina H sintasas (PGHS), las cuales presentan dos isoformas principales, COX-1 y COX-2 (o PGH sintasa 1 y 2), habiéndose identificado también a la COX-3, generada por splicing alternativo a partir del gen que codifica a COX-1 (Feng y col. 1993; Munroe y Lau 1995; Chandrasekharan y col. 2002). Las enzimas COXs se han identificado en membranas celulares, asociadas a la capa lipídica interna de membranas tanto del retículo endoplasmático como de la envoltura nuclear. Esta localización diferente se ha vinculado con la capacidad de sintetizar prostanoides que serán, en el primer caso, liberados al medio extracelular para actuar en forma parácrina a través de receptores de membrana, mientras que en el segundo caso conducirá a la formación de prostaglandinas que interactuarán con receptores nucleares (Morita y col. 1995; Spencer y col. 1998).

Las enzimas COXs son bifuncionales, ya que primero convierten ácido araquidónico en PGG₂ intermediaria (ciclooxigenación), y luego reducen PGG₂ por peroxidación para generar PGH₂ (Ueno y col. 2001). Una variedad de sintasas específicas terminales, convierten a PGH₂ en los distintos prostanoides estables (TXA₂, PGF_{2α}, PGE₂, PGD₂, PGI₂) (Helliwell y col. 2004) (Figura 7).

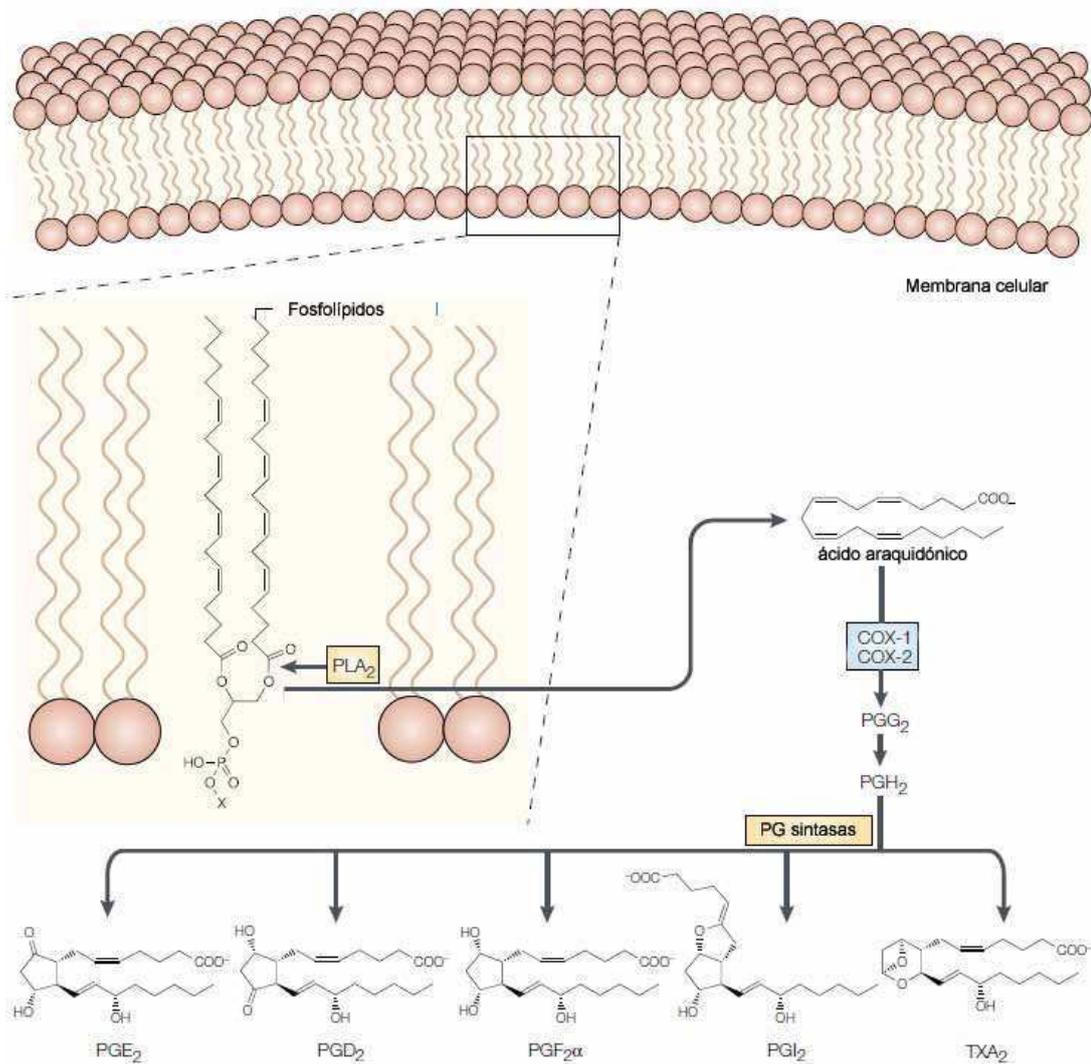


Figura 7. Síntesis de PGs. Esquema adaptado de Gupta y Dubois 2001.

Las prostaglandinas pueden ser rápidamente sintetizadas *de novo* por la mayoría de las células y actúan de forma autocrina y paracrina. La presencia de prostaglandinas ha sido detectada en casi todos los tejidos ejerciendo un amplio espectro de funciones biológicas. Entre otras, contribuyen en la inflamación, el mantenimiento del tono del músculo liso, la hemostasis, la trombosis, las secreciones gastrointestinales, y participan en diversos procesos reproductivos (Tsuboi y col. 2002).

La PGE₂ puede sintetizarse virtualmente por cualquier tipo celular de forma constitutiva o luego de estimulación y puede actuar a través de diferentes receptores, por este motivo, sus efectos biológicos son diversos y muy complejos dependiendo de la concentración de PGE₂, del tipo tisular o del subtipo de receptor expresado en la células blanco (Funk 2001; Sugimoto y Narumiya 2007).

Se han descrito hasta ahora cuatro receptores para la PGE₂, denominados EP1-4. Estos receptores pueden encontrarse en la membrana plasmática pero también se han observado en la membrana nuclear (Bhattacharya y col. 1998). Estudios con ratones knockout para los receptores de PGE₂, han demostrado que la misma tiene un rol tanto en procesos fisiológicos como en situaciones patológicas (Kobayashi y Narumiya 2002). Ha sido ampliamente estudiada en cáncer, dado que sus niveles se encuentran incrementados en varios tipos de tumores humanos (LeFever y Funahashi 1990; Rigas y col. 1993). Actualmente se encuentra en estudio la PGE sintasa como blanco terapéutico para el tratamiento de las patologías relacionadas con desbalances en PGE₂ (Samuelsson y col. 2007).

La PGE₂ se encuentra involucrada en procesos inflamatorios como dolor, edema, enrojecimiento y al ser una PG vasodilatadora contribuye a incrementar el flujo sanguíneo a los tejidos inflamados (Funk 2001). También es una PG moduladora de la respuesta inmune (Harris y col. 2002).

Un balance en la síntesis de la PGD₂, PG antiinflamatoria, y PGE₂ con propiedades proinflamatorias determina la estabilidad de la placa aterosclerótica en humanos (Cipollone y col. 2004).

En el tracto gastrointestinal, la PGE₂ tiene un rol en la protección gástrica por mucosa y en la secreción y motilidad gastrointestinal, también se encuentra involucrada en patologías inflamatorias como la enfermedad de Crohn, otras infecciosas y en el cáncer colorrectal (Ahrenstedt y col. 1994; Eberhart y col. 1994; Resta-Lenert y Barrett 2002).

La ciclopentanona 15deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandina J₂ (15dPGJ₂) es un derivado de PGD₂ que posee importantes propiedades antiinflamatorias. Utilizando un modelo de inflamación en rata, se observó que COX-2 ejerce funciones pro-inflamatorias a través del incremento en la síntesis de PGE₂ durante el desarrollo de la inflamación, pero ejerce funciones anti-

inflamatorias mediadas por la generación de PGD_2 y 15dPGJ_2 durante la fase de resolución de los procesos inflamatorios (Gilroy y col. 1999).

En contraste con las prostaglandinas clásicas, que se unen a receptores de membrana específicos acoplados a proteína G (Coleman y col. 1994), no se ha encontrado un receptor transmembrana específico para 15dPGJ_2 , aunque tiene una débil actividad agonista con el receptor de PGD_2 en células natural killer y neutrófilos (Zhang y Young 2002). En cambio, la 15dPGJ_2 puede ejercer sus efectos a través de interacciones con blancos intracelulares, incluyendo receptores nucleares, así como también proteínas no receptoras cuya función es modificada por la interacción covalente con 15dPGJ_2 .

El blanco de 15dPGJ_2 intracelular mejor estudiado es el receptor activado por proliferadores peroxisomales γ ($\text{PPAR}\gamma$). En efecto los PPARs han demostrado ser los receptores de varios prostanooides (Yu y col. 1995; Forman y col. 1997). La función de estos receptores nucleares se describirá con más detalle posteriormente.

También la PGI_2 ejerce varias de sus funciones activando a $\text{PPAR}\delta$. La PGI_2 es una de las más abundantes PGs en la vasculatura, y algunos de sus efectos como la vasodilatación son mediados en parte mediante la activación de $\text{PPAR}\delta$, mientras que su función anticoagulante es ejercida principalmente por su receptor de membrana, receptor de siete pasos transmembrana acoplado a proteína G (Mitchell y col. 2008).

En cardiomiocitos, la PGI_2 mediante la activación de $\text{PPAR}\delta$ regula la expresión del gen de la carnitina palmitoiltransferasa-1 (CPT-1), enzima limitante de la beta oxidación de ácidos grasos (Kuroda y col. 2007). Alteraciones en el gen de la PGI sintasa han sido relacionadas con un incremento en la incidencia de infarto de miocardio (Nakayama y col. 2002).

La PGI_2 se encuentra involucrada en el mantenimiento de la homeostasis renal (Nasrallah y Hebert 2005) y, de forma interesante, se observó que existe una reducción en la expresión del receptor de membrana de PGI_2 en el riñón de ratas diabéticas (Nasrallah y Hebert 2004).

También se observó que ejerce efectos citoprotectores en cerebro, previniendo el daño neuronal (Satoh y col. 1999) y que posee un rol en el control del desarrollo de cáncer pulmonar (Tennis y col. 2010).

La acción de la PGI_2 es contrarrestada por la del tromboxano A_2 (TXA_2) que es un potente inductor de la agregación plaquetaria, de la vasoconstricción

y de la broncoconstricción (Hamberg y col. 1975; Svensson y col. 1976; Moncada y Vane 1978). TXA_2 juega un rol importante en situaciones patofisiológicas como el infarto de miocardio, angina de pecho inestable, desórdenes trombóticos, hipertensión pulmonar y asma (Hamm y col. 1987; Fitzgerald y col. 1989; Dogne y col. 2002). Alteraciones en el balance $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$ se encuentran relacionados con la aterosclerosis (Pratico y col. 2000).

En la patología diabética se observa un incremento en la síntesis de varios prostanoides mediado por un aumento en la expresión de COX2 que influye en la homeostasis vascular (Bagi y col. 2006). El perfil de prostanoides sintetizado es tejido específico y se determina por la expresión y acción de las PGs sintetasas (Bagi y col. 2006). Niveles incrementados de PGE_2 y PGI_2 se han encontrado en la microvasculatura del músculo esquelético de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (Myers y col. 1985). También en la retina de ratas diabéticas se observaron incrementos de la PGE_2 (Ayalasomayajula y col. 2004). En el desarrollo de la nefropatía diabética se encuentran involucradas alteraciones en PGs vasodilatadoras glomerulares como PGE_2 y PGI_2 junto a una acción local constrictora de las arteriolas eferentes renales por TXA_2 (Cherney y col. 2008).

Prostanoides en los procesos reproductivos fisiológicos e impacto de la diabetes mellitus

Debe destacarse la importancia de las PGs en varios aspectos reproductivos que incluyen la ovulación, la implantación, procesos de morfogénesis y de desarrollo embrionario, la función placentaria y en procesos vinculados al parto y al desarrollo postnatal (Fuchs y Fuchs 1984; Norwitz y col. 2001; Jawerbaum y Gonzalez 2005; Stouffer y col. 2007).

La PGE_2 es un componente clave de la ovulación (Davis y col. 1999). Además, se ha observado que existe un incremento en la producción de PGI_2 durante el comienzo del desarrollo del cuerpo lúteo en la cabra (Kawate y col. 2004).

En el embrión normal, durante el período de pre-implantación, se sintetizan PGs que se encuentran involucradas en el transporte embrionario a través del tracto genital femenino y son requeridas para el anclaje del

blastocisto al endometrio (Baskar y col. 1981). En humanos, el oviducto secreta altas concentraciones de PGI₂ (Huang y col. 2002) y en embriones de ratones en cultivo, el suplemento del medio de cultivo con PGI₂ incrementa la salida de los blastocistos de la zona pelúcida y el número de implantaciones (Huang y col. 2003; Huang y col. 2004).

El proceso de implantación requiere la biosíntesis de PGs como mediadores del incremento en la permeabilidad vascular endometrial para la implantación del blastocisto y la decidualización (Wang y Dey 2005). PGE₂ y PGF_{2α}, son PGs pro-inflamatorias cuyos niveles aumentan en el útero durante los días peri-implantatorios y disminuyen en el período post-implantatorio (Novaro y col. 1996; Novaro y col. 1998). PGE₂ y PGI₂ se encuentran claramente involucradas en el proceso de decidualización (Lim y Dey 2000; Gillio-Meina y col. 2009).

Se destacan los hallazgos que identificaron la importancia de la prostaciclina (PGI₂) durante el proceso implantatorio (Lim y col. 1999). En efecto, los ratones deficientes para COX-2 son infértiles, y la administración de PGI₂ revierte dicha anomalía y permite la implantación y el posterior desarrollo embrionario mediante la activación de PPARδ por dicha PG (Lim y Dey 2000). También la PGE₂ tiene un rol clave durante la implantación en ratas (Lim y col. 1999; Cong y col. 2006).

Investigaciones sobre la influencia de la diabetes durante la implantación, han mostrado que los niveles de PGE₂ y de la citoquina pro-inflamatoria TNFα se incrementan en el útero de las ratas diabéticas durante la implantación; incremento que permanece luego de la implantación (Pampfer y col. 1997; Novaro y col. 1998). De este modo, la sobreproducción de estos agentes pro-inflamatorios en el útero diabético puede alterar el proceso normal de implantación y ser uno de los probables mecanismos del incremento de abortos, posiblemente debido a potentes efectos de PGE₂ sobre la contractilidad uterina o quizás simplemente por interrumpir el delicado diálogo embrión-endometrio (Jawerbaum y Gonzalez 2005).

En embriones de ratas diabéticas durante el período del organogénesis temprana cobra relevancia el defecto en la producción y liberación de PGE₂ (Jawerbaum y col. 2000), PG necesaria para el cierre de tubo neural; y cuyos reducidos niveles se vinculan claramente al incremento en los defectos de cierre de tubo neural inducidos por la

diabetes materna, principal malformación congénita inducida por esta patología (Jawerbaum y Gonzalez 2005). Por otro lado se ha observado una reducción en la producción de $15dPGJ_2$ en embriones de rata diabética en etapa de organogénesis temprana (Jawerbaum y col. 2002).

Los niveles séricos de TXA_2 y $PGF_{2\alpha}$ se encuentran incrementados durante la preeclampsia (Friedman 1988; Granger y col. 2001) y en la placenta diabética se evidencian incrementos en la relación TXA_2/PGI_2 que implican, tal como ocurre en otras patologías como la arteriosclerosis, importantes anomalías en el flujo sanguíneo por incremento de prostanoïdes vasoconstrictores y menor producción de prostanoïdes vasodilatadores (Kuhn y col. 1990).

Durante el parto, tanto la $PGF_{2\alpha}$ como la PGE_2 tienen roles fundamentales habiéndose observado un incremento de las mismas en el amnios y la decidua (Olson y col. 1983; Khan y col. 1992; Schellenberg y Kirkby 1997).

La PGE_2 es un importante vasodilatador en el neonato, en particular tiene un importante efecto relajante en el tono vascular del ductus arterioso, arteria que conecta la aorta con la arteria pulmonar durante el desarrollo fetal. De forma interesante, este efecto se pierde en el recién nacido cuando el ductus arterioso debe cerrarse para un normal desarrollo de la circulación aórtico y pulmonar (Clyman y col. 1983; Abrams y col. 1995).

Las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

Las especies reactivas del oxígeno

Los radicales libres son especies químicas capaces de existir en forma independiente que contienen electrones desapareados por lo cual son sumamente reactivos y generan reacciones en cadena. El oxígeno molecular (O_2) es indispensable para muchos procesos metabólicos vitales para la vida aerobia, sin embargo si los individuos son expuestos a concentraciones elevadas, pueden sufrir daños que pueden ser tanto reversibles como irreversibles o incluso inducir muerte celular. El O_2 es un di-radical que

requiere de cuatro electrones para su completa reducción a agua como producto final de la cadena de transporte de electrones (Figura 8).

Las reacciones de donación de electrones al O_2 , generan especies reactivas del oxígeno (ROS) como productos intermedios, las cuales pueden ser radicalarias como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el hidroxilo (compuestos altamente reactivos), y no radicalarias como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Figura 8) (Giordano 2005).

Las ROS pueden ser generadas por una gran variedad de mecanismos en las células de organismos con metabolismo aerobio. Son producidos principalmente en mitocondrias, como así también en peroxisomas, citosol y retículo endoplásmico.

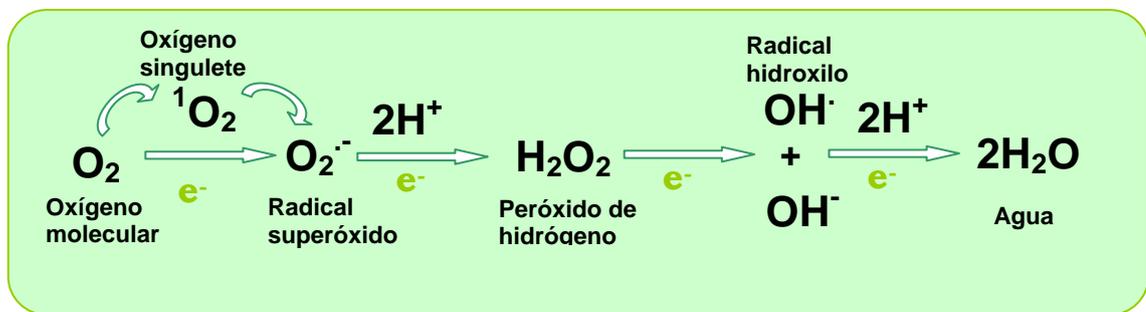


Figura 8. Esquema de reducción del oxígeno molecular.

Las ROS pueden también ser producidas en los tejidos por acción enzimática, por enzimas como la óxido nítrico sintasa, la xantina oxidasa, NADPH oxidasa y citocromo P450. También se producen en el proceso de autooxidación de catecolaminas, el metabolismo del ácido araquidónico y en la cadena respiratoria mitocondrial (Xia y col. 1998; Griendling y col. 2000).

En las células existen sistemas de defensa específicos, cuya función es la de metabolizar las ROS. Los mismos se denominan sistemas de defensa antioxidante y se los puede clasificar en dos grandes grupos: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Dentro del primer grupo encontramos a enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, mientras que formando parte de los antioxidantes no enzimáticos podemos nombrar al glutatión, ácido ascórbico, ácido úrico, vitamina E, coenzima Q10 y los carotenos (Nordberg y Arner 2001).

El estrés oxidativo es una situación en la cual las concentraciones intracelulares de las ROS se encuentran incrementadas sobre los valores fisiológicos. Puede producirse por aumento en la velocidad de producción de las mismas, una disminución de los niveles de antioxidantes o una combinación de ambas (Sies y Cadenas 1985).

Función biológica de las especies reactivas del oxígeno

Entre los roles fisiológicos que poseen las ROS podemos mencionar la producción de O_2^- por parte de las células fagocíticas que participa en la eliminación de microorganismos y su intervención en el sistema de defensa para eliminar xenobióticos o sustancias pro-cancerígenas. El H_2O_2 de origen mitocondrial, actúa como regulador de las vías de muerte celular (Bindoli y col. 2008). Se ha visto a las ROS involucradas en cascadas de señalización celular, regulación metabólica y respuestas adaptativas (Turpaev 2002). Las ROS producidas durante el ejercicio moderado, son requeridas para una normal producción de fuerza por parte del músculo esquelético (Gomez-Cabrera y col. 2008).

Sin embargo, las acciones más ampliamente conocidas de las ROS son aquellas vinculadas con un rol patológico, ya que las mismas interactúan de manera directa con biomoléculas como lípidos, proteínas y el ADN ocasionando daño y muerte celular. Este hecho ocurre cuando se produce un importante desbalance entre las especies oxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Halliwell 2007). Las ROS producen alteraciones a nivel de la estructura proteica, ya que incrementan la carboxilación de las proteínas, ocasionando pérdida de su funcionalidad (Stadtman y Levine 2003). A nivel del ADN, las ROS inducen la ruptura de sus hebras, oxidación de las purinas o entrecruzamiento entre proteínas nucleares y el ADN (Suematsu y col. 2003).

Se encuentra bien caracterizado el efecto de la peroxidación lipídica sobre la función de los lípidos celulares, ocasionando daño a nivel de las membranas biológicas, como así también de las organelas, alterando la fluidez y estructura de las mismas (Rathore y col. 1998). Del mismo modo, el daño producido por las ROS sobre los lípidos bioactivos que median vías

de señalización intercelular, conduce a profundas alteraciones de dichas vías. Dadas estas acciones deletéreas, las ROS están implicadas en el desarrollo de patologías como cáncer, diabetes mellitus, aterosclerosis, isquemia, enfermedades neurodegenerativas, etc. (Droge 2002; Spitteller 2006; Adibhatla y Hatcher 2008).

El óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es un gas diatómico simple, es un radical libre por lo que puede reaccionar con un gran número de moléculas, y el hecho de que sea gaseoso facilita su pasaje entre las células y tejidos. Tiene una vida media muy corta ya que rápidamente es metabolizado produciendo nitratos y nitritos, sus metabolitos estables. Estas propiedades bioquímicas hacen que el NO sea una molécula de señalización importante ejerciendo un amplio rango de efectos biológicos.

El NO es sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, mediante la acción de una enzima citosólica, la óxido nítrico sintasa (NOS) en casi todas las células. Esta reacción enzimática requiere de O₂ y NADPH, obteniéndose como productos de la misma el NO, NADP y citrulina (Figura 9).

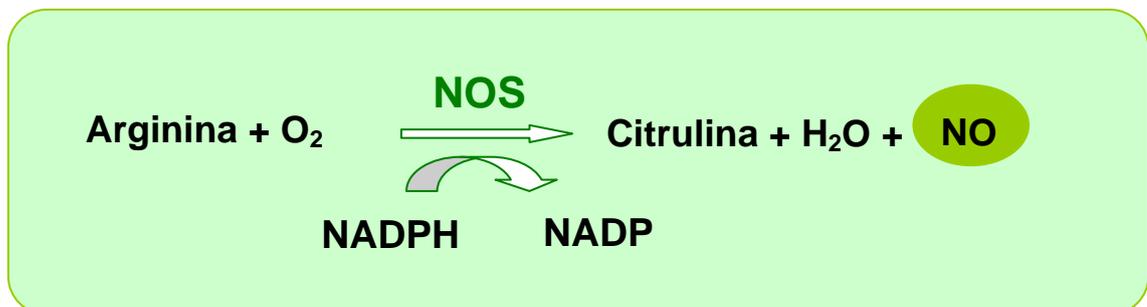


Figura 9. Síntesis del NO.

Existen tres isoformas de la enzima NOS que son codificadas por diferentes genes, con diferentes localizaciones, regulaciones, propiedades catalíticas y sensibilidad a inhibidores (Forstermann y col. 1994). La NOS neuronal (nNOS o tipo I), NOS inducible (iNOS o tipo II) y NOS endotelial (eNOS o tipo III).

La eNOS se expresa en células endoteliales (Palmer y col. 1988), plaquetas (Radomski y col. 1990), células del músculo liso, cardíacas (Balligand y col. 1995), células óseas (Fox y Chow 1998) y neuronas (Bredt y col. 1990), entre otras. La eNOS se expresa constitutivamente pero su expresión puede aumentar por ejemplo por la tensión de roce producida por el flujo sanguíneo (Nishida y col. 1992). Su actividad es regulada por Ca^{2+} y calmodulina (Forstermann y col. 1991).

La nNOS es una enzima constitutiva, es la fuente predominante de NO en las neuronas (Chen y col. 2004; Jiang y col. 2004). La nNOS se encuentra presente también en el músculo esquelético, cardíaco y músculo liso donde el NO controla el flujo sanguíneo y la contractilidad muscular (Schwarz y col. 1999; Xu y col. 1999; Stamler y Meissner 2001; Rothe y col. 2005). Su actividad, al igual que la eNOS, también es regulada por Ca^{2+} y calmodulina (Bredt y col. 1992).

Sin embargo, la iNOS es independiente de la concentración de Ca^{2+} (Kleinert y col. 2003). Su expresión puede inducirse en un amplio rango de células y tejidos mediante citoquinas y otros compuestos. Su promotor posee sitios de unión para diversos factores de transcripción como AP-1, C/EBP, CREB, NF- κ B, NF-IL6, p53, Sp1, SRF, STAT, etc. (Kleinert y col. 2003). Es por ello que su expresión se incrementa en diversos procesos patológicos, inflamatorios e infecciosos en muchos tipos celulares como: macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, células endoteliales, músculo liso vascular, etc (Moncada y col. 1991).

Función biológica del óxido nítrico

El NO puede tener tanto propiedades citotóxicas como citoprotectoras dependiendo de su concentración. Bajo condiciones fisiológicas cuando la producción de NO es baja, interactúa directamente con moléculas biológicas. Por otro lado, las reacciones mediadas por las especies reactivas del nitrógeno derivadas de la reacción del NO con el O_2 o O_2^- se producen cuando el flujo de NO se encuentra incrementado, por ejemplo durante procesos inflamatorios.

El NO puede reaccionar rápidamente con otros radicales libres como el O_2^- formando peroxinitritos, radicales altamente reactivos y tóxicos (Beckman y Koppenol 1996).

Respecto al mecanismo de acción del NO, este compuesto ejerce sus funciones principalmente uniéndose a enzimas que contienen hierro. En efecto, la vía de señalización más importante involucra su unión a la guanilato ciclasa soluble, una metaloproteína que contiene un grupo hemo. La acción del NO en el sitio activo de la guanilato ciclasa activa la enzima y es responsable de los clásicos efectos mediados por el GMP cíclico y proteína quinasa G como la vasodilatación (Denninger y Marletta 1999).

Otra de las hemoproteínas que son reguladas por el NO es la citocromo C oxidasa. La interacción del NO con esta enzima mitocondrial es competitiva con el O_2 , siendo de esta forma el NO un inhibidor reversible de la cadena de respiración mitocondrial que controla el gradiente de O_2 en los tejidos (Shiva y col. 2001).

El NO interactúa también con la hemoglobina y mioglobina, esta interacción secuestra el NO previniendo la activación de la guanilato ciclasa. Además, la interacción del NO con la hemoglobina promueve su transición a una forma de baja afinidad por el oxígeno, estimulando la liberación del O_2 a los tejidos (Kosaka 1999).

Además de regular hemoproteínas, el NO y sus derivados transducen señales a través de la oxidación de lípidos y modificación post-traducciona de proteínas como la nitración, nitrosilación y oxidación de sus cadenas laterales.

Entre las funciones fisiológicas del NO encontramos aquellas donde este compuesto actúa como agente regulatorio, siendo la más estudiada la relajación del tono vascular (Moncada y col. 1988). El NO interviene en la regulación de la activación plaquetaria, causando inhibición de la adhesión y agregación, y produciendo disgregación de las plaquetas (Forstermann y col. 1994; Alexander 1998). De esta forma el NO producido por la eNOS ejerce funciones vasodilatadoras y ejerce acciones antitrombóticas (impidiendo la formación de la placa de ateroma).

En el sistema nervioso, el NO producido difunde en forma retrógrada desde la neurona postsináptica hacia la presináptica, produciendo la liberación de neurotransmisores presinápticos. A nivel del sistema nervioso periférico se lo considera el mediador de la transmisión

no-adrenérgica y no-colinérgica en la musculatura del tracto gastrointestinal, respiratorio, y genitourinario (Nathan 1992). Además el NO interviene en mecanismos involucrados con la plasticidad neuronal y la capacidad de memoria (Arnaiz y col. 2004).

También el NO actúa como agente antioxidante interviniendo en reacciones de tipo rédox donde puede formar complejos con metales (Droge 2002), inducir la expresión de enzimas antioxidantes e incrementar la concentración del glutatión intracelular (Jawerbaum y col. 1996; Forman y col. 1997; Moellering y col. 1999).

Los macrófagos son unas de las principales fuentes de NO (Espey y col. 2000), la producción de este compuesto les permite desarrollar su actividad en la defensa del huésped contra agentes patógenos (MacMicking y col. 1997).

Una excesiva producción de NO está asociada con muerte celular (Murphy 1999), neurotoxicidad (Dawson y col. 1991) e inflamación (Gross y Wolin 1995). El NO afecta enzimas claves involucradas en la cascada apoptótica a través de la nitración e inhibición de las caspasas y Poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (Li y col. 1997; Sidorkina y col. 2003). Niveles incrementados de NO inducen la fosforilación de la proteína p53 disparando una respuesta apoptótica (Hussain y col. 2003). Se ha demostrado que la iNOS interacciona específicamente con COX-2 nitrándola e incrementando su actividad catalítica, estimulando de esta manera la producción de PGs en diferentes tejidos (Kim y col. 2005).

Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la patología diabética

El NO tiene un papel activo en la destrucción de los islotes de Langerhans de las células β pancreáticas que conduce al desarrollo de la patología diabética (Gonzalez y col. 2000).

La patología diabética está asociada a un incremento del estrés oxidativo, el cual juega un importante rol en el desarrollo de las complicaciones presentes en esta patología. Los tejidos que son insulino-independientes para la captación de glucosa, presentan daño tisular temprano y son órganos blanco para las principales complicaciones de la

diabetes, entre ellos la retina, nervios periféricos y los glomérulos renales (Ferreira y col. 1988). El estado de hiperglucemia conduce a la producción de productos finales de glicosilación avanzada provocando la pérdida de la funcionalidad de biomoléculas. Además, origina un incremento del metabolismo de la glucosa que activa vías no tradicionales como la proteína quinasa C, la vía de las hexosaminas, la vía de los polioles, exceso de oxidación mitocondrial y formación de prostaglandinas con el consecuente incremento en la producción de O_2^- (Ruderman y col. 1992; Brownlee 2001).

Existe evidencia que demuestra que el estado de hiperglucemia puede colapsar los sistemas de defensa antioxidante (Boveris y col. 1985). Este desbalance redox conduce a la activación de NF- κ B y por lo tanto a una sobreexpresión de iNOS, generando más NO (Cosentino y col. 1997). El anión superóxido reacciona con el NO generando ONOO $^-$, potente agente oxidante que ataca biomoléculas llevando a la disfunción celular por múltiples mecanismos (Szabo 2003). El ONOO $^-$ causa peroxidación lipídica, inhibe el transporte mitocondrial de electrones, genera ruptura de la estructura del ADN, produce la nitración de residuos de tirosina y la oxidación de grupos sulfhidrilos de las proteínas, interfiriendo con las vías de señalización celular (Ischiropoulos y col. 1992).

La nitración de la PGI sintasa, enzima generadora de PGI $_2$, PG vasodilatadora y el desacoplamiento de la NOS, enzima sintetizadora de NO, son ejemplos de cómo las ROS contribuyen a una angiogénesis defectuosa y a defectos circulatorios por disminución de agentes vasodilatadores. Además, las ROS activan vías proinflamatorias que causan cambios epigenéticos en genes pro-inflamatorios que persisten a largo plazo, luego de que la glucemia se haya normalizado (Giacco y Brownlee 2010). Existen estudios que demuestran que la sobreexpresión de la superóxido dismutasa, enzima que facilita la formación de H $_2$ O $_2$ a partir de O_2^- , en ratones transgénicos previene la retinopatía, nefropatía y cardiomiopatía diabética (Shen y col. 2006; Zhang y col. 2006; Ceradini y col. 2008).

Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en procesos reproductivos fisiológicos e impacto de la diabetes

El NO está involucrado en múltiples funciones reproductivas, varios estudios demostraron que en la ovulación normal el NO está involucrado en la sincronización de los ciclos estrales, el comportamiento durante el apareo, la regulación de la función ovárica, la activación de las gametas, la maduración del ovocito y en el proceso de ovulación. También está vinculado con la fertilización, la implantación, el proceso de decidualización y la división celular del embrión temprano (Jawerbaum y col. 1998; Knauf y col. 2001; Norwitz y col. 2001; Thaler y Epel 2003).

La formación de la placenta y el rápido crecimiento del sincitiotrofoblasto en la gestación temprana, está asociado con un mayor requerimiento de flujo sanguíneo en el endometrio. En la gestación se ha evidenciado un incremento de nitratos (productos del metabolismo del NO) y de nitrosilhemoglobina en sangre de ratas preñadas en relación a las no preñadas, este hecho sugiere que existe un incremento en la biosíntesis de NO durante la gestación, necesario para cubrir las mayores demandas tisulares (Conrad y col. 1993).

El NO es el principal regulador del flujo placentario, actúa como un potente vasodilatador en la circulación feto-placentaria (Myatt y col. 1991), y su función es la de mantener el tono basal vascular y atenuar la acción de agentes vasoconstrictores tales como los tromboxanos y la endotelina-1 (Myatt y col. 1992). El NO también interviene en el proceso de diferenciación e invasividad de trofoblastos, y en la angiogénesis durante el desarrollo placentario (Novaro y col. 1997; Ahmed y Perkins 2000).

También en la gestación existe un aumento fisiológico del estrés oxidativo como consecuencia del incremento de la actividad metabólica de las mitocondrias presentes en el tejido placentario (Wisdom y col. 1991).

Durante la organogénesis temprana el NO actúa como morfógeno conduciendo a la diferenciación celular o a la apoptosis, por ello su localización y concentración debe estar finamente regulada para una normal organogénesis (Lee y Juchau 1994; Jawerbaum y Gonzalez 2005).

Se ha observado que altos niveles de NO en cultivos *in vitro* inducen alteraciones en la morfogénesis de las ramas pulmonares durante la organogénesis (Young y col. 2002), mientras que bajos niveles de este agente causan defectos en el desarrollo de los miembros (Tiboni y col. 2003). Además, diferentes trabajos muestran la influencia del NO en el desarrollo y diferenciación neuronal (Peunova y Enikolopov 1995).

La vasculogénesis se inicia en el saco vitelino antes que en el embrión y se observa que durante este proceso en este tejido, se expresan tanto iNOS como eNOS en forma secuencial y que la regulación en la producción de NO es fundamental para un desarrollo vascular normal (Nath y col. 2004). El NO también interviene en el proceso de cardiomiogénesis y en la angiogénesis miocárdica, se ha evidenciado que la eNOS se expresa constitutivamente en cardiomiocitos en la embriogénesis temprana y produce NO (Bloch y col. 1999; Zhao y col. 2002). También se ha demostrado que ratones deficientes en eNOS muestran defectos de las válvulas cardíacas y del septum ventricular (Feng y col. 2002). En roedores, el corazón embrionario expresa iNOS y eNOS en el estadio de corazón tubular, este hecho sugiere un importante rol de estas enzimas para el desarrollo de este órgano (Bloch y col. 1999).

Durante la gestación, el NO mantiene la quiescencia uterina ya que a través del aumento del GMP cíclico, mantiene el músculo liso uterino relajado. También está involucrado con el desencadenamiento del trabajo de parto, momento en el cual se ve incrementada la producción de NO que induce la activación de la enzima COX y el consiguiente incremento de prostanoídes, también involucrados en este evento (Buhimschi y col. 1996; Jawerbaum y col. 1996; Gonzalez y col. 1998).

En la patología diabética, estudios realizados en los ovarios de ratas con diabetes severa, demuestran que a pesar de existir niveles incrementados de NO y de actividad NOS, las vías de señalización del NO no son funcionales y de hecho los niveles de GMP cíclico se encuentran disminuidos (Jawerbaum y col. 1999).

Dado que el NO cumple funciones críticas durante el desarrollo embrionario, existen múltiples vías regulatorias que controlan la concentración de NO requeridas para un desarrollo embrionario normal, sin embargo varias de estas vías se encuentran afectadas por la diabetes

materna (Jawerbaum y Gonzalez 2005). En efecto se ha evidenciado que diversos agentes como la endotelina-1, PGE₂, 15deoxydelta^{12,14}PGJ₂ y leptina regulan negativamente la producción de NO durante la organogénesis, y que sus concentraciones se encuentran alteradas en embriones y fetos en modelos experimentales de diabetes (Jawerbaum y col. 2002; Jawerbaum y col. 2005; White y col. 2007)

Se han encontrado niveles de NO incrementados en embriones provenientes de diversos modelos experimentales de diabetes, tanto en el período de organogénesis temprana como en el período fetal (Jawerbaum y col. 2001; Jawerbaum y col. 2005; Pustovrh y col. 2005). También se localizaron aumentos de la actividad de la NOS en el corazón de fetos de ratas diabéticas (Pustovrh y col. 2007).

Asociado a la mayor inducción de malformaciones, los embriones en el período de organogénesis temprana presentan daño inducido por peroxinitritos en modelos experimentales de diabetes. En los mismos se observan altos niveles de residuos de nitrotirosina en el tubo neural, en los pliegues neurales y en el corazón en desarrollo (Jawerbaum y col. 2005).

Existe amplia evidencia que demuestra que el estrés oxidativo cumple un rol importante en la inducción de las complicaciones de la diabetes durante la gestación. El daño oxidativo producto de las especies radicalarias sobre el ADN, los lípidos y las proteínas en los embriones de ratas diabéticas está involucrado en la inducción de eventos teratogénicos (Viana y col. 2000).

En hígados fetales provenientes de ratas diabéticas en la gestación a término se han observado importantes alteraciones como resultado del estrés oxidativo presente en el entorno diabético. Dentro de estas alteraciones se ha observado la presencia de proteínas carboniladas y de peroxidación lipídica, mostrando daño que posiblemente afecta la función tanto de proteínas como de lípidos en este órgano (Cederberg y col. 2001).

En la placenta diabética, la respuesta vascular a agentes vasoactivos se ve afectada por diversos procesos fisiopatológicos como la progresiva glicosilación proteica del tejido conectivo de la vasculatura feto-placentaria (Bucala y col. 1991). Existe una disminuida reactividad de la vasculatura feto-placentaria como resultado de las alteraciones producidas por el ONOO⁻, viéndose afectadas las vías de trasducción de

señales y los receptores involucrados en ellas ocasionando cambios en la contractilidad de la vasculatura feto-placentaria. Esta vasculatura disfuncional no permite que la placenta responda en forma adecuada a las demandas de oxígeno y nutrientes por parte del feto en desarrollo, hecho que podría explicar el incremento en la morbilidad y mortalidad fetal presentes en las gestaciones diabéticas (Kossenjans y col. 2000).

Al analizar la placenta de rata en el período de post-placentación, se han encontrado niveles mayores de NO incluso en modelos experimentales de diabetes moderada. En la diabetes moderada se evidencia un claro aumento en la actividad de la NOS pero no en los niveles de iNOS o eNOS, sugiriéndose que estarían involucrados mecanismos post-transcripcionales en la regulación de la actividad de la NOS en la unidad feto-placentaria (Pustovrh y col. 2007). El NO modula positivamente los niveles de las metaloproteasas de la matriz extracelular, observándose un aumento de la actividad de las mismas en la placenta a mediados de la gestación, alteraciones vinculadas con los desarreglos en la composición de la matriz extracelular presentes en las placentas diabéticas (Pustovrh y col. 2005).

Se ha observado una producción incrementada de NO en las placentas de pacientes diabéticas en comparación con las controles, probablemente como consecuencia de una mayor cantidad y actividad de las isoformas iNOS y eNOS (Schonfelder y col. 1996; Figueroa y col. 2000; Pustovrh y col. 2000). Además, en las placentas de mujeres en la gestación a término se han encontrado altos niveles de residuos de nitrotirosina, índice del daño producido por ONOO⁻ (Lyll y col. 1998; Kossenjans y col. 2000).

Las metaloproteasas de la matriz extracelular

La matriz extracelular (MEC) fue considerada durante mucho tiempo sólo una estructura que brindaba anclaje y soporte mecánico a las células en los organismos pluricelulares. Actualmente, se sabe que la matriz extracelular es una estructura compleja y dinámica que contiene factores de crecimiento, proteínas de unión y otras biomoléculas, como así

también sitios de unión de moléculas de superficie celular. La MEC interactúa constantemente con las células, las mismas se unen y desunen de la MEC secretando proteínas que modifican el ambiente de la MEC. Las interacciones MEC-célula median procesos como la supervivencia, apoptosis, división y diferenciación celular que son fundamentales durante el desarrollo embrionario (Goody y Henry 2010).

La remodelación dinámica de la MEC depende en gran parte de las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs), una gran familia de endopeptidasas zinc-dependientes que, colectivamente, son capaces de degradar todos los componentes de la MEC (Nagase y Woessner 1999). Actualmente se encuentran descritas al menos 25 tipos de MMPs diferentes en vertebrados, 24 de las cuales se encuentran presentes en humanos (Puente y col. 2003). La cercanía evolutiva que relaciona las diferentes proteasas componentes de la familia de las MMPs puede verse reflejada en la conservación de los dominios que componen su estructura, sus mecanismos catalíticos y de regulación.

La estructura general de las MMPs consiste en un propéptido con un interruptor de cisteína, un dominio catalítico, un péptido de unión y un dominio hemopexina (ver Figura 10). Sin embargo, la familia de las MMPs ha evolucionado en diferentes grupos por remoción de algunos dominios o incorporación de otros.

La familia de las MMPs puede dividirse en 5 subgrupos basados en sus sustratos de preferencia o similitudes estructurales:

- 1) Las colagenasas que degradan principalmente el colágeno fibrilar.
- 2) Las gelatinasas cuya acción diferencial es degradar principalmente el colágeno desnaturalizado pero que también degradan el colágeno de tipo I, IV, V, VII, X y IX, la elastina, la fibronectina, la laminina, entre otros componentes de la MEC.
- 3) Las estromelisininas que degradan componentes no relacionados con el colágeno presentes en la MEC.
- 4) Las metaloproteasas de membrana (MT-MMPs) que poseen un dominio de anclaje a membrana celular, pueden clivar una amplia variedad de sustratos componentes de la MEC y son importantes activadores de la proMMP2.
- 5) Las matrilisininas que se caracterizan por la ausencia del dominio hemopexina, cumplen importantes roles en la degradación de componentes de la MEC como colágeno tipo IV, laminina y entactina (ver

Figura 10). Existen también otras MMPs menos caracterizadas, o no incluidas dentro de esta clasificación.

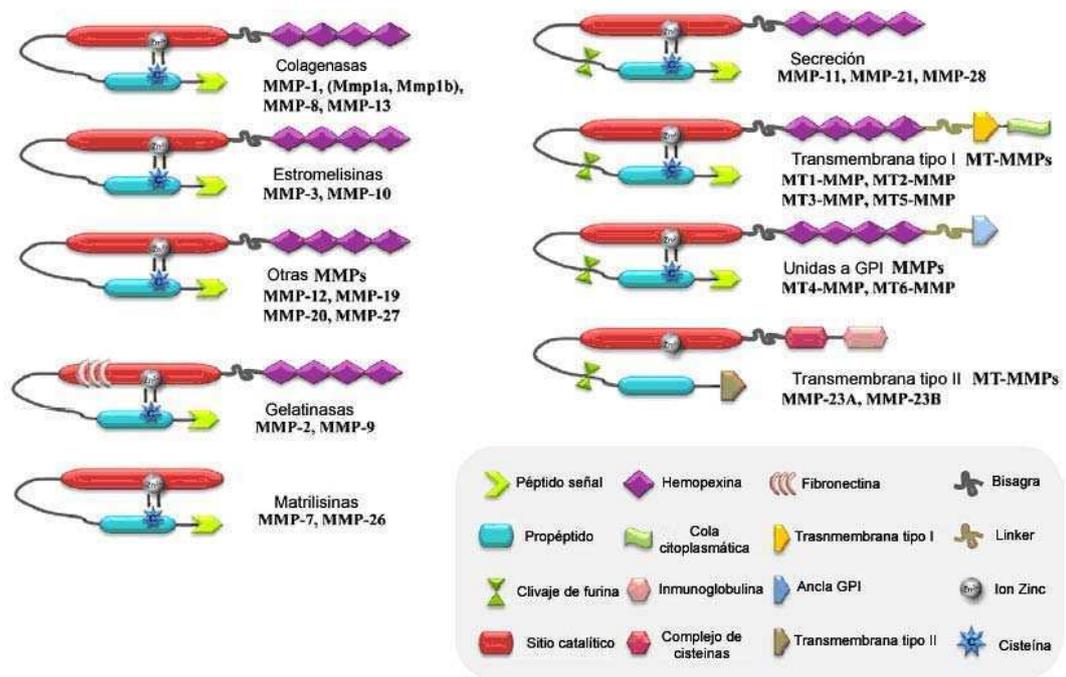


Figura 10. Familia de metaloproteasas. Esquema de Fanjul-Fernandez y col. 2010.

Hace ya varios años que se ha postulado que estas enzimas ejercen funciones reguladoras del comportamiento celular también a través del procesamiento proteolítico controlado de una amplia variedad de moléculas de señalización y regulando la actividad de las mismas. Así las colagenasas pueden procesar biomoléculas componentes de la MEC como interleukina-8 (IL-8) (Tester y col. 2007), factor de necrosis tumoral (TNF α) (Gearing y col. 1994) y proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP). Las estromelisininas pueden clivar moléculas como las E-caderinas e IL-1 β (Overall 2002) y participan en la activación de la proMMP9 (Geurts y col. 2008), y las gelatinasas pueden clivar biomoléculas como TNF α (Gearing y col. 1994), factor de crecimiento transformante- β (TGF β) (Yu y Stamenkovic 2000), proteína quimioattractante de monocitos-3 (MCP3) (McQuibban y col. 2000) y pueden liberar factores crípticos con propiedades anti o pro angiogénicas (Egeblad y Werb 2002).

La actividad de las MMPs es requerida durante el desarrollo y en procesos fisiológicos para degradar moléculas de la MEC y permitir la migración celular, alterar el microambiente de la MEC resultando en la regulación del comportamiento celular y modular la actividad de moléculas con actividad biológica mediante su clivaje directo o la liberación de su unión a la MEC (Vu y Werb 2000)(Figura 11).

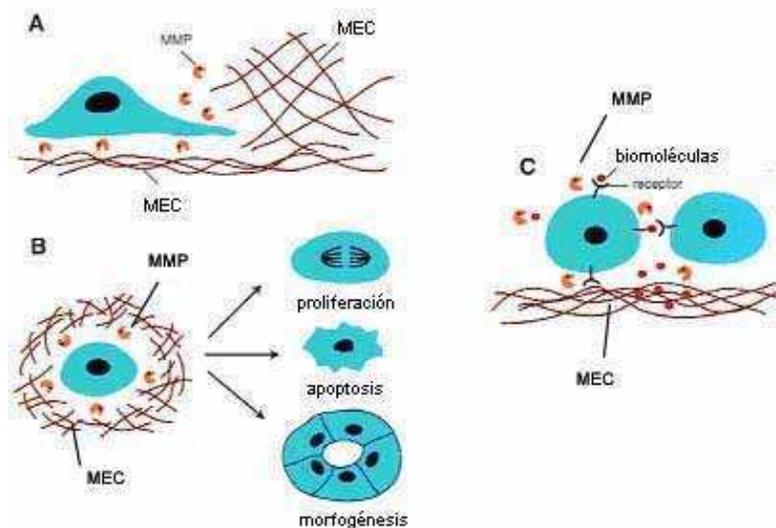


Figura 11. Esquema de acción de MMPs adaptado de Vu y Werb 2000 (A) Las MMPs pueden inducir la migración cambiando el fenotipo celular de uno adhesivo a uno no-adhesivo por degradación de la MEC. (B) Las MMPs pueden alterar el microambiente dando lugar a la proliferación, apoptosis o morfogénesis celular. (C) Las MMPs pueden modular la actividad biológica de moléculas como factores de crecimiento, citoquinas o de sus receptores por clivaje directo o liberación de su unión a la MEC.

Dado que un exceso de actividad metaloproteásica podría generar daño e incluso destrucción tisular, las MMPs están estrictamente reguladas a múltiples niveles. La transcripción de las mismas está regulada por múltiples estímulos incluyendo citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento, glucocorticoides y retinoides (Yan y Boyd 2007). Algunos de los factores de transcripción involucrados en la regulación génica de MMPs son el activador de proteínas-1 y -2 (AP-1, AP-2), el factor nuclear kappa B (NFκB) y los transductores y activadores de la transcripción (STAT) (Overall y Lopez-Otin 2002).

Otro de los puntos clave en la regulación de las MMPs es la activación del zimógeno. El prodominio mantiene la enzima inactiva por medio de la formación de un grupo tiol entre la cisteína del carbono

terminal al átomo de zinc del sitio activo. Para que la enzima adquiera actividad, la unión cisteína-zinc necesita alterarse, esto puede ocurrir por la acción proteolítica de otras MMPs sobre el prodominio o por un cambio conformacional producido por un agente químico, como el NO o las ROS (Gu y col. 2002; Pustovrh y col. 2002) (Pustovrh y col. 2000; Jian Liu y Rosenberg 2005). Cuando esto sucede el grupo tiol se hidrata y la enzima adquiere la capacidad de hidrolizar el propéptido para su completa activación. Este sistema de regulación lleva el nombre de “interruptor de cisteína” (Figura 12). De forma diferente a las otras MMPs, se ha descrito que la MMP2 necesita de la presencia de TIMP2 para ser activada por MT1-MMP. TIMP2 se une al sitio activo de la MT1-MMP y por su dominio carboxilo terminal al dominio tipo hemopexina de la MMP2 (Visse y Nagase 2003). Por otro lado, recientes estudios señalan que en presencia de ciertos sustratos, la MMP2 puede ser activa aún incluso en su forma de zimógeno (Ra y Parks 2007).

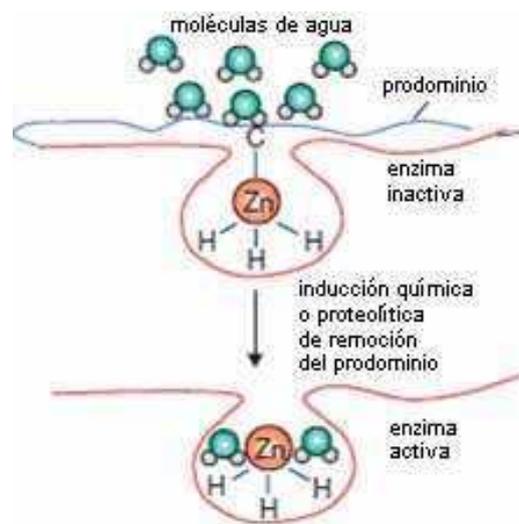


Figura 12. Activación de las prometaloproteasas. Esquema adaptado de Somerville 2003.

Una vez activa, existen múltiples inhibidores que pueden regular la actividad de las MMPs. Al menos cuatro clases de inhibidores de las MMPs están presentes en los espacios extracelulares y en los fluidos corporales, los más relevantes son los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs), proteínas de 20 a 30 kDa que interaccionan de manera directa con

las MMPs uniéndose al sitio activo por medio de un pequeño número de aminoácidos. Actualmente están descriptos cuatro TIMPs: TIMP1, TIMP2, TIMP3 y TIMP4, los mismos poseen la capacidad de inhibir todas las MMPs y serán descriptos con más detalle en la siguiente sección.

Entre las otras clases de inhibidores, un pequeño péptido derivado de la proteólisis de la procolágeno-C-proteinasa presenta alta afinidad con la secuencia aminoácidica de los TIMPs e inhibe a las MMPs por un mecanismo similar al de éstos (Mott y col. 2000), y una proteína de membrana denominada RECK puede regular la actividad de las MMP-2, MMP-9 y MT1-MMP por interaccionar con su sitio activo (Oh y col. 2001). Por último, se encuentra la α 2-macroglobulina (α 2-M), una proteína plasmática que puede actuar como capturador de las MMPs, dado que su clivaje por MMPs origina un rápido cambio conformacional que resulta en una unión covalente que inhibe la actividad de las propias MMPs. Este complejo es luego internalizado y destruido por las células (Barrett 1981).

Dentro de la familia de MMPs, las MMP2 y MMP9 pertenecientes al subgrupo de las gelatinasas han sido ampliamente estudiadas en procesos tanto fisiológicos como patológicos. Estructuralmente, se diferencian de otras proteasas por contener tres secuencias repetidas similares a la fibronectina tipo II en la región amino terminal del dominio catalítico, esto le brinda la especificidad para la unión a gelatina (Steffensen y col. 1995) (Shiple y col. 1996) (Figura 11).

Participes en múltiples procesos de remodelación tisular, en tejidos adultos su desregulación marca eventos que denotan daño tisular. Se observó que la MMP2 se encuentra aumentada en la íntima de las arterias de ratas envejecidas (Li y col. 1999) y que tanto la MMP2 como MMP9 se encuentran aumentadas en fluidos de heridas dérmicas crónicas (Bullen y col. 1995). Además, en diversas patologías como la fibrosis hepática, la MMP2 principalmente y, en menor medida, la MMP9 se encuentran incrementadas (Arthur 2000); en aterosclerosis, el incremento en la expresión de la MMP9 arterial está relacionada con la destrucción de la matriz que lleva a la ruptura de la placa ateromatosa (Brown y col. 1995). La MMP9 también se incrementa durante la remodelación del ventrículo izquierdo que ocurre durante el desarrollo de la insuficiencia cardíaca congestiva (Nagatomo y col. 2000) y está involucrada en la remodelación del tejido pulmonar que ocurre

en respuesta al síndrome de distrés respiratorio (Ricou y col. 1996). También se ven involucradas en procesos relacionados con la inmunidad innata dado que la MMP2 cliva al factor quimioattractante de monocitos-3 (MCP-3) regulando su funcionalidad (McQuibban y col. 2000).

Participación de las MMPs en los procesos reproductivos fisiológicos y patológicos

Las MMPs están involucradas en los procesos reproductivos, participando activamente en la ovulación, menstruación, decidualización, implantación del trofoblasto, desarrollo fetal y dilatación del cérvix en el parto (Hulboy y col. 1997; Kaitu'u y col. 2005). Durante la decidualización *in vivo* se observa expresión de MMP2 en las células del estroma endometrial (Nuttall y Kennedy 1999), mientras que cuando se induce la decidualización en células del estroma endometrial en cultivo, se ve que las mismas presentan gran actividad tanto de MMP2 como MMP9 (Matsumoto y col. 2009). En roedores se determinó que durante la implantación, la invasión del epitelio uterino por el trofoblasto involucra la degradación de la membrana basal y de la matriz extracelular endometrial. Esta acción es coordinada en conjunto por la secreción de MMP2 y MMP9 por parte del blastocisto y la decidua materna. Luego de la implantación, la expresión de MMP9 se localiza principalmente en las células gigantes del trofoblasto del cono ectoplacentario en ratones (Reponen y col. 1995; Alexander y col. 1996), mientras que en la rata se observa expresión tanto de la MMP9 como de la MMP2 en la zona decidual primaria en el día 6 de preñez y en toda la decidua en el día 7 de preñez de rata (Zhao y col. 2002), acorde avanza la preñez, se observa la expresión de la MMP2 principalmente localizada en la zona de la decidua mesometrial donde ocurre el proceso de placentación (Das y col. 1997). En un estadio posterior se observa que la placenta de rata secreta MMP2 y MMP9 y su actividad está regulada por los niveles de NO placentarios (Pustovrh y col. 2007).

En humanos se observó que los trofoblastos secretan alta cantidad de gelatinasas durante el primer trimestre de gestación, acompañando el establecimiento y la diferenciación del órgano placentario (Polette y col.

1994). En esta etapa cobra importancia la secreción de MMP9 por parte de los trofoblastos que invaden la vasculatura materna y modifican la estructura de las arterias espirales (Blankenship y King 1994). Una disminución en la secreción de esta proteasa está asociada a la pobre invasión de las arterias maternas por parte de los citotrofoblastos y se vincula de manera directa con el advenimiento de fallas en la circulación placentaria que desencadenan la preeclampsia (de Jager y col. 2003; Merchant y Davidge 2004). También se observan niveles incrementados de MMP2 en el líquido amniótico durante el segundo trimestre de embarazo en pacientes que posteriormente desarrollaron preeclampsia (Lavee y col. 2009).

Por su parte, el blastocisto murino también libera MMP9 y MMP2 y las mismas son sintetizadas por las células trofoblásticas (Brenner y col. 1989; Chen y col. 2007). Durante la gastrulación del embrión de pollo, se ha observado que la MMP2 está involucrada en la degradación de la membrana basal de las células del epiblasto, importante para el ingreso de las células mesodérmicas a través de la línea primitiva (Mogi y Toyozumi 2010). Es poco lo que se sabe del rol de las MMPs en el embrión durante el período de organogénesis, sin embargo los eventos posteriores de morfogénesis de los órganos fetales están caracterizados por el incremento en la actividad de las MMPs que participan en la morfogénesis cardíaca (Linask y col. 2005), la ramificación de los ductos de la glándula salival, los pulmones y las glándulas mamarias (Nakanishi y col. 1986; Witty y col. 1995; Simian y col. 2001), así como la diferenciación de las estructuras que componen los arcos mandibulares (Chin y Werb 1997).

Desregulación de las MMPs en la patología diabética

En la diabetes un gran número de complicaciones están relacionadas con un desbalance en la actividad de las MMPs. En estudios realizados en pacientes diabéticos con patologías renales crónicas, se observa un incremento en los niveles y actividad de las MMP2 y MMP9 que correlacionan con rigidez arterial, disfunción endotelial y angiogénesis alterada en estos pacientes (Chung y col. 2009). Las personas con diabetes tipo 1 poseen niveles incrementados de MMP9 y MMP2 séricas

(Gharagozlian y col. 2009) y existe una relación directa entre la progresión de angiopatías en pacientes diabéticos tipo 1 con un marcado incremento de la MMP-2 plasmática (Derosa y col. 2005).

Respecto al desarrollo de aterosclerosis, se observa un incremento de la actividad de MMP2 y MMP9 sintetizadas por macrófagos en las placas ateroscleróticas de pacientes diabéticos relacionados con un incremento en la expresión de la PGE₂ sintasa (Cipollone y col. 2001) y del receptor de productos finales de glicosilación avanzada (RAGES). Se postula que las MMPs inducirían la ruptura de la placa ateromatosa (Cipollone y col. 2003).

De forma interesante, en modelos experimentales de diabetes se determinó que los niveles incrementados de MMP2 plasmáticos son responsables de un incremento en la degradación de moléculas de adhesión de las uniones estrechas intercelulares, como la ocludina, en la barrera hematoencefálica, provocando una mayor permeabilidad en la misma (Hawkins y col. 2007). Además, una incrementada actividad de MMP2 y MMP9 en homogenatos de tejido ocular de ratas diabéticas se asocia con el desarrollo de retinopatías (Bhatt y Addepalli).

Estudios realizados en nuestro laboratorio, nos muestran que durante la gestación, la actividad de MMP9 en tejido placentario de mujeres diabéticas pregestacionales a término se encuentra incrementada (Pustovrh y col. 2000). Además, estudios desarrollados en modelos experimentales de diabetes inducidos por estreptozotocina muestran que durante el período peri-implantatorio la MMP-2 se incrementa en tejido uterino diabético (Pustovrh y col. 2002) y en la placenta de ratas diabéticas a mediados de la gestación se observa un incremento en la expresión y actividad de la MMP2 y MMP9 (Pustovrh y col. 2005) vinculados a una alta producción de NO y especies reactivas del oxígeno (Pustovrh y col. 2005; Pustovrh y col. 2007). A su vez a nivel fetal se evidencian también mayores niveles y actividad de MMP2 en las ratas diabéticas (Pustovrh y col. 2005).

Los inhibidores tisulares de las metaloproteasas

Los inhibidores tisulares de las metaloproteasas de matriz extracelular (TIMPs) son los principales inhibidores naturales de la actividad de las MMPs. Hasta ahora, se han caracterizado cuatro TIMPs designados TIMP-1, -2, -3, -4. Son moléculas que poseen un peso molecular de alrededor de 21 KDa, algunas con capacidad para ser glicosidadas. La estructura de los TIMPs tiene seis puentes disulfuro que forman tres loops en el dominio N-terminal y tres loops en el dominio C-terminal (Lambert y col. 2004) (Figura 13). La mayoría de las funciones biológicas conocidas de los TIMPs hasta el momento se atribuyen al dominio N-terminal de la proteína; aunque es el dominio C-terminal el que interactúa con el dominio hemopexina de las proMMP2 y proMMP9 dejando el dominio N-terminal libre para interactuar con otra MMP, como es el caso del complejo TIMP2-proMMP2-MT1-MMP; se sabe que bajas concentraciones de TIMP2 se vinculan con la activación de la MMP2 mediada por MT1-MMP, mientras que altas concentraciones de TIMP2 inhiben la activación de la proMMP2 mediada por la MT1-MMP (Kinoshita y col. 1998; Kurschat y col. 1999).

TIMP1 forma preferencialmente complejos con la proMMP9 (Wilhelm y col. 1989), mientras que TIMP3 tiene la capacidad de unirse tanto a la proMMP9 como a la proMMP2 (Butler y col. 1999). También TIMP4 puede unirse al dominio C-terminal de la proMMP2 (Bigg y col. 1997) y de forma interesante también forma complejos TIMP4-proMMP2-MT1-MMP pero que en lugar de inducir la activación de la proMMP2 conduce a un mecanismo inhibitorio de la activación de dicha proenzima (Bigg y col. 2001). TIMP2 y TIMP3 también son efectivos inhibidores de las MMPs de membrana (MT-MMPs) (Bode y Maskos 2001). TIMP3 también puede inhibir algunos miembros de la familia ADAM como ADAM17 y ADAMTS4 y 5 (Amour y col. 1998; Kashiwagi y col. 2001).

A pesar de que todos los TIMPs son capaces de inhibir la actividad proteolítica de la forma activa de MMPs, difieren en varios aspectos incluyendo su solubilidad, su capacidad de glicosilarse, su interacción con las proMMPs, el patrón de expresión tisular y la regulación de su expresión.

La inhibición de la actividad proteolítica de las MMPs por los TIMPs se realiza formando complejos de unión no covalente de estequiometría 1:1 con las mismas (Murphy y Willenbrock 1995). Una de las cisteínas del dominio N-terminal del TIMP interacciona con el Zn^{2+} del sitio activo de la proMMP protegiendo la hidrólisis del prodominio de la proMMP (Brew y Nagase 2010).

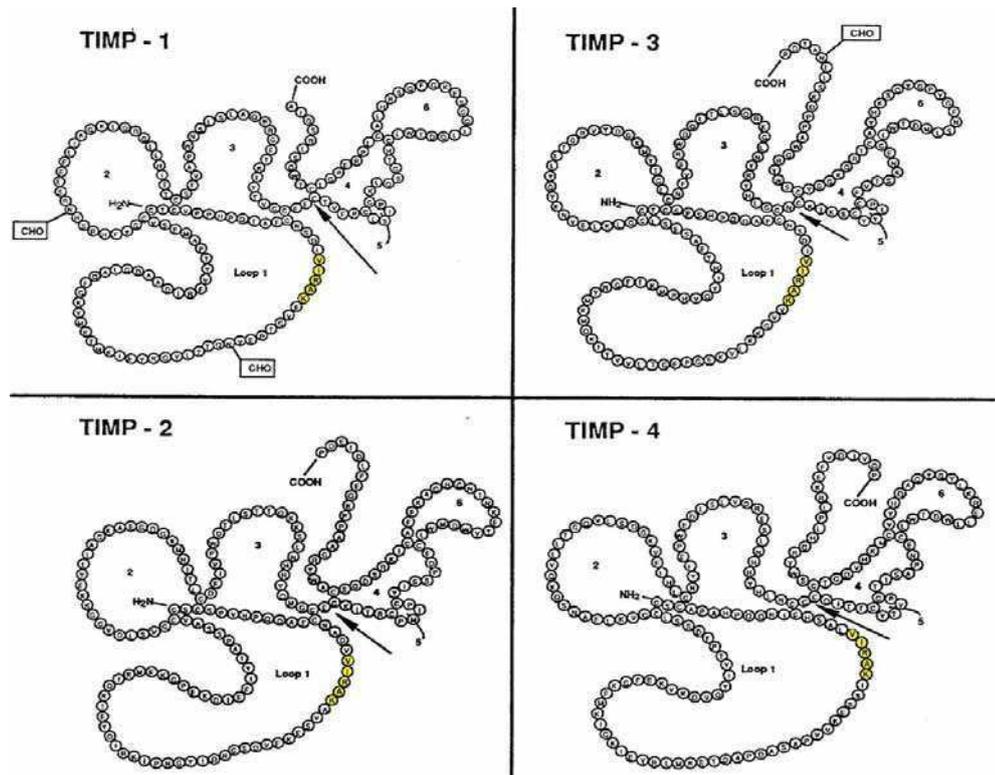


Figura 13. Estructura primaria de los TIMPs. Esquema adaptado de Murphy y Willenbrock 1995.

TIMP1 es una proteína soluble y glicosilada con un peso molecular de 28.5 a 35 KDa dependiendo de su grado de glicosilación. La glicosilación juega un rol importante en su correcto plegamiento, su transporte hacia la superficie celular y su estabilidad (Caterina y col. 1998). Se expresa en una variedad de células como fibroblastos, células epiteliales y endoteliales, osteoblastos, condroicitos, células del músculo liso y varias líneas de células tumorales (Welgus y col. 1985; Cawston y col. 1986; Bord y col. 1999). Se observa en varios tejidos en el adulto, entre ellos los tejidos reproductivos y

en el cerebro, corazón, pulmón y riñón fetales (Nuttall y col. 2004). Estímulos externos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento fibroblástico (b-FGF), ésteres de forbol y citoquinas como las interleuquina-6 (IL-6), IL-1 e IL1 β inducen la expresión de TIMP1, mientras que el ácido retinoico disminuye su expresión en osteoblastos (Overall 1995; Lambert y col. 2004). Además, se sabe que el factor de crecimiento TGF- β regula positivamente la transcripción de TIMP1 (Overall 1994).

Las principales alteraciones de los ratones TIMP1^{-/-} se observan en el ciclo reproductivo. Se evidencian anomalías en la duración del estadio de estro, alteraciones en la esteroidogénesis durante el desarrollo del cuerpo luteo, en la morfología uterina y en los niveles hormonales (Nothnick 2000; Nothnick 2003). Utilizando ratones knockout de TIMP1, se determinó que esta proteína tiene un rol como regulador de la remodelación tisular cardíaca (Roten y col. 2000). Por otro lado, en un modelo murino de obesidad inducida por una dieta con alto contenido graso, los ratones TIMP1^{-/-} desarrollan menos tejido adiposo, indicando que TIMP1 tiene un rol promotor de la adipogénesis (Lijnen y col. 2003).

TIMP2 también es una proteína soluble pero a diferencia de TIMP1, TIMP2 no posee sitios de glicosilación, su peso molecular es de 21 KDa y su promotor contiene varios sitios Sp1, secuencia característica de un gen constitutivo, consistente con la observación de su expresión en casi todos los tejidos murinos (Nuttall y col. 2004; Clark y col. 2008). Su expresión se regula negativamente por TGF- β y ésteres de forbol (Stetler-Stevenson y col. 1990) y por lipopolisacáridos (Shapiro y col. 1992).

Los ratones TIMP2^{-/-} muestran defectos en el sistema nervioso central y en la miogénesis, entre ellos defectos motores, una disminución en el crecimiento de neuritas cerebelares y un retardo en la diferenciación neuronal (Perez-Martinez y Jaworski 2005; Jaworski y col. 2006).

En un modelo de diabetes en ratas donde existe una mayor apoptosis en las células notocordales del adulto que induce degeneración de los discos intervertebrales, se observó que dicha alteración se encuentra relacionada con un incremento en los niveles de MMP2, MMP9 y de TIMP1 y TIMP2 (Won y col. 2009).

TIMP3 es una proteína que posee sitios para glicosilación y tiene un peso molecular de 22 a 27 KDa, a diferencia de TIMP1 y TIMP2, TIMP3 es

el único TIMP que se encuentra fuertemente unido a proteoglicanos de la MEC (Yu y col. 2000) (Figura 14). Su expresión se induce por ésteres de forbol, EGF y TGF- β (Leco y col. 1994). En el ratón adulto su expresión se detecta principalmente en riñón, corazón, pulmón y cerebro (Leco y col. 1994).

De forma interesante se observa que los ratones TIMP3^{-/-} alimentados con una dieta rica en grasas desarrollan intolerancia a la glucosa e insulino resistencia por un mecanismo que involucra la sobreactivación de la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en hígado la cual normalmente es inhibida por TIMP3 (Fiorentino y col. 2010).

TIMP4 es una proteína soluble que no posee sitios de glicosilación y que posee un peso molecular de 22 KDa. Poca información se encuentra disponible acerca de este TIMP, su expresión es altamente selectiva y se evidencia en el adulto principalmente en cerebro y corazón y, en menor medida, en riñón, páncreas, colon y testículos (Greene y col. 1996; Nuttall y col. 2004).

Actualmente, se sabe que los TIMPs tienen múltiples actividades biológicas que incluyen la regulación de la proliferación celular, la migración celular, la modulación de la angiogénesis, la transmisión sináptica, y pueden tener propiedades anti o pro-apoptóticas (Brew y Nagase 2010). Estas actividades pueden deberse en parte a la inhibición de MMPs, dado que el catabolismo de la MEC influencia el comportamiento celular, aunque algunas de estas funciones mostraron ser independientes de la inhibición de MMPs dado que inhibidores sintéticos de las MMPs no poseen varias de estas actividades y mutantes de TIMPs que no inhiben MMPs pueden tener actividad similar (Stetler-Stevenson 2008). En este sentido se postula que existirían receptores específicos para cada TIMP que mediarían estas funciones, si bien aún no se encuentran totalmente caracterizados (Hayakawa y col. 1994; Emmert-Buck y col. 1995; Stetler-Stevenson 2008) (Figura 14).

TIMP1 y TIMP2 tienen un efecto regulador del crecimiento celular en células epiteliales, mesenquimales y líneas celulares tumorales (Bertaux y col. 1991; Hayakawa y col. 1992; Corcoran y Stetler-Stevenson 1995). TIMP2 no solo inhibe el comportamiento invasivo y metastático de células cancerígenas sino que también decrece el crecimiento tumoral *in vivo*

(DeClerck y col. 1992; Imren y col. 1996). Se ha demostrado que también TIMP3 posee un rol estimulador de la proliferación celular en cultivo de fibroblastos de pollo (Yang y Hawkes 1992).

Existe evidencia que indica que tanto TIMP1 como TIMP2 ejercen parte de sus efectos a través de varias vías de señalización intracelular. TIMP2 induce proliferación de fibroblastos, fibrosarcoma y de células endoteliales vía un incremento en la concentración del AMPc y actividad de la proteína kinasa A (PKA) (Corcoran y Stetler-Stevenson 1995; Kraling y col. 1999). TIMP1 y TIMP2 inducen la fosforilación en tirosina de proteínas intracelulares, estimulando la activación de kinasas activadas por mitógenos (MAPK) en una línea celular de osteosarcoma humano (Yamashita y col. 1996).

Los TIMPs también poseen un rol regulador de la apoptosis celular. Se observó que la expresión de TIMP1 está asociada a la resistencia de apoptosis de una línea celular de linfoma (Guedez y col. 1998), función que no se restringe a líneas tumorales ya que también se observó que TIMP1 previene la apoptosis mediada por citoquinas en una línea de células β pancreáticas secretoras de insulina, mejorando en paralelo la funcionalidad de los islotes pancreáticos en cultivo (Han y col. 2001), función relevante para el estudio de trasplantes de islotes pancreáticos. De forma interesante, se observó que TIMP-1 secretado por las células madre embrionarias implantadas para el tratamiento del infarto de miocardio, inhiben la apoptosis de cardiomiocitos (Singla y McDonald 2007). También se ha observado que TIMP2 tiene actividad anti-apoptótica en cultivo celular de melanoma (Valente y col. 1998) aunque en el caso de este TIMP, su rol en apoptosis es más controversial dado que se ha observado que puede inducir apoptosis en linfocitos T (Lim y col. 1999). En cambio, se ha descrito un rol promotor de apoptosis para TIMP3 en células del músculo liso vascular (Baker y col. 1998) y en varios tipos tumorales (Bian y col. 1996) (Baker y col. 1999), Ahonen y col confirmaron que en melanomas, esta función de TIMP3 se daría mediante la inhibición de MMPs, estabilizando receptores inductores de apoptosis (Ahonen y col. 2003).

Además, se ha estudiado el rol de los TIMPs en la angiogénesis, observándose que los cuatro TIMPs tienen propiedades anti-angiogénicas. La actividad anti-angiogénica de TIMP2 es mediada por su interacción con

la integrina $\alpha_3\beta_1$ (Seo y col. 2003), considerada por algunos autores como el receptor de este TIMP. Además, TIMP2 se expresa en las células endoteliales y tiene un rol en la estabilización de las redes capilares (Saunders y col. 2006). En el proceso de angiogénesis *in vivo*, en células trasfectadas con TIMP2 se observa una reducción de la formación de vasos sanguíneos y una reducida migración endotelial e invasión *in vitro* (Valente y col. 1998). TIMP3 se une directamente al receptor de factor de crecimiento del endotelio vascular-2 (VEGF) y bloquea la acción del VEGF en células endoteliales (Qi y col. 2003).

Respecto a TIMP-4, es poca aún la información disponible y la mayoría se encuentra asociada a la posible utilización de la inhibición de esta molécula como tratamiento para cáncer, dado que se observó que los niveles de expresión de TIMP-4 están incrementados en tumores de ovario, cervicales y cerebrales (Groft y col. 2001; Lizarraga y col. 2005; Ripley y col. 2006).

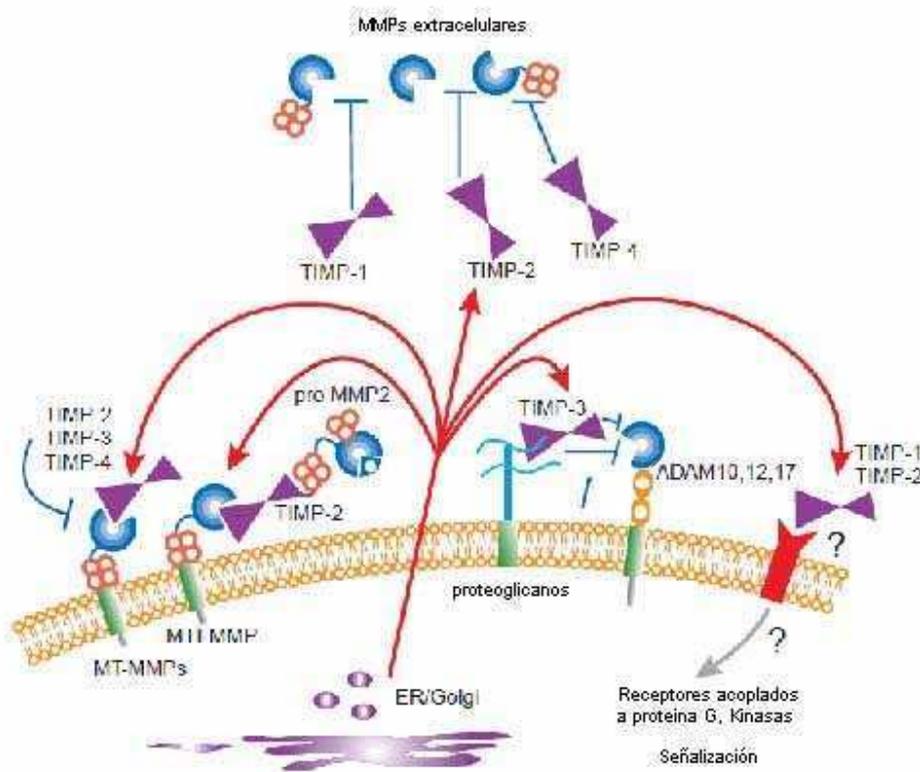


Figura 14. Esquema de acción de TIMPs. TIMP1, 2, 3, 4 son inhibidores de las MMPs solubles, unidas a MEC y asociadas a las células. TIMP3 es una proteína asociada a proteoglicanos de la MEC que también inhibe a la familia ADAM. TIMP2 actúa en conjunto con MT1-MMP como receptor de la proMMP2 permitiendo su activación. En algunos tipos celulares, TIMP1 y TIMP2 podrían tener receptores que regularían el comportamiento de la célula mediante una cascada de transducción de señales intracelular. Esquema adaptado de Baker y col. 2002.

Participación de los TIMPs en los procesos reproductivos fisiológicos y patológicos

Se ha observado que TIMP1 se expresa predominantemente en tejidos esteroidogénicos como el ovario y la placenta (Nuttall y col. 2004). TIMP1 estimula la esteroidogénesis en las células de Leydig en el testículo y en las células de la granulosa en el ovario (Boujrad y col. 1995; Nothnick y Curry 1996). Durante el período de formación del cuerpo lúteo, es requerida la expresión de TIMP1 en el ovario para una normal función lútea y folicular (Duncan y col. 1996). En cuanto a situaciones patológicas, se ha observado que en el fluido folicular de pacientes con poliquistosis ovárica hay mayores concentraciones tanto de TIMP1 como TIMP2 (Baka y col. 2010). Además, un estudio epidemiológico ha mostrado que un polimorfismo en el promotor del gen de TIMP2 que modula negativamente este gen se ha asociado con un incremento de endometriosis (Kang y col. 2008).

Durante la implantación embrionaria murina, se observa que la expresión de TIMP1 se incrementa en los sitios de implantación desde el comienzo de dicho proceso hasta el día 9.5 de gestación (último día evaluado), la expresión de TIMP2 se mantiene constante en este período y la expresión de TIMP3 es alta a comienzos de la implantación y disminuye temporalmente hasta hacerse imperceptible en el día 8.5 de gestación (Alexander y col. 1996). Los TIMPs estimulan la migración celular de las células del endodermo parietal del blastocisto (Behrendtsen y Werb 1997) y se ha observado que la angiogénesis del saco vitelino del embrión de pollo inducida por poliaminas fue inhibida por TIMP1 y TIMP2 (Takigawa y col. 1990).

Durante el desarrollo embrionario, la remodelación de la matriz extracelular es esencial para los rápidos cambios morfológicos, y las anomalías en el recambio de la matriz extracelular podrían ser críticas para el crecimiento y la migración celular (Brenner y col. 1989). Sin embargo, no se han realizado estudios previos sobre los TIMPs en el embrión en etapa de organogénesis. En un estadio posterior, en el feto murino, la expresión de TIMP-2 se observa en cerebro, tejido muscular, corazón, pulmón, riñón y en tejido óseo entre otros (Blavier y Delaisse 1995). De forma interesante, se

observa una expresión sexo dependiente de TIMP1 durante el desarrollo gonadal de ratón (Guyot y col. 2003).

También se observa expresión tanto de TIMP2 como de TIMP3 en la placenta murina (Blavier y Delaisse 1995). Estudios previos de nuestro laboratorio muestran niveles reducidos de TIMP3 en la placenta de ratas diabéticas a término (Pustovrh y col. 2009).

Células NK uterinas de la decidua humana, que se postula que poseen un rol en la regulación de la invasión trofoblástica y en el remodelamiento de las arterias espiraladas, secretan TIMP2 en el primer trimestre de gestación (Naruse y col. 2009). En pacientes que desarrollaron preeclampsia en el embarazo, se observan niveles incrementados de TIMP2 en el líquido amniótico durante el segundo trimestre (Lavee y col. 2009).

En el neonato se ha observado que la proporción MMP9/TIMP1 se encuentra incrementada en sangre de cordón umbilical de recién nacidos prematuros que posteriormente desarrollaron displasia broncopulmonar (Fukunaga y col. 2009).

Durante la lactancia, se observa en ratones hembra TIMP3^{-/-} una apoptosis acelerada del tejido mamario por lo que esta proteína tendría un rol como factor de supervivencia en la involución de la glándula mamaria (Fata y col. 2001).

PPARs

Receptores activados por proliferadores peroxisomales

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) son factores de transcripción activables por ligandos cuya naturaleza es mayormente lipídica, pertenecientes a la superfamilia de receptores hormonales nucleares. Hasta ahora se han identificado tres isotipos de este receptor, codificados por genes diferentes: PPAR α (NR1C1), PPAR δ (PPAR β o NR1C2) y PPAR γ (NR1C3). Sus secuencias se encuentran altamente conservadas entre las especies, existiendo más de un 80% de homología entre el ratón, la rata y el humano (Fajas y col. 1997; Kersten y col. 2000;

Lewis y col. 2002). Cada isotipo se expresa diferencialmente en tejidos selectos, con niveles de expresión y función particular (Hihi y col. 2002).

La secuencia aminoacídica primaria de PPARs está organizada como la de otros receptores nucleares de la superfamilia, con un dominio A/B N-terminal que contiene una función de transactivación independiente de ligando (AF-1) y el dominio C de unión al ADN, con la estructura característica hélice-vuelta-hélice, responsable de la unión a elementos de respuesta a proliferadores peroxisomales (PPRE) en la región promotora de genes blanco (Figura 16) (Hi y col. 1999). El dominio D es una región bisagra que puede modular la unión al ADN y está involucrada en la unión a co-represores (Kumar y Thompson 1999). El dominio E/F tiene una fuerte función de activación dependiente de ligando (AF-2) y también es el dominio de dimerización y de interacción con cofactores (Figura 16) (Blanquart y col. 2003; Feige y col. 2006).

Los PPARs constituyen heterodímeros con el receptor del ácido 9-cis retinoico (RXR) (Mangelsdorf y Evans 1995), cuyo ligando es el ácido 9-cis retinoico (Levin y col. 1992) y para el cual se han descrito tres isoformas denominadas RXR α , RXR β y RXR γ (Mangelsdorf y col. 1992; Maden 2000). El mecanismo de acción clásico de estos receptores es similar al que presentan otros miembros de esta familia. La unión del ligando al heterodímero induce un cambio conformacional en la estructura proteica que permitirá la disociación de proteínas represoras como NCoR, mediador de silenciamiento para receptores de retinoides y tiroideos (SMRT) o desacetilasas de histonas (HDAC) y su asociación con proteínas co-activadoras como la proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico (p300/CBP), coactivador del receptor de esteroides (SRC-1), la proteína de unión a PPAR (PBP) y la RNA polimerasa III. Se producirá entonces la unión a la secuencia PPRE y la modulación de la expresión de genes blanco que contienen dicha secuencia reguladora (Figura 16).

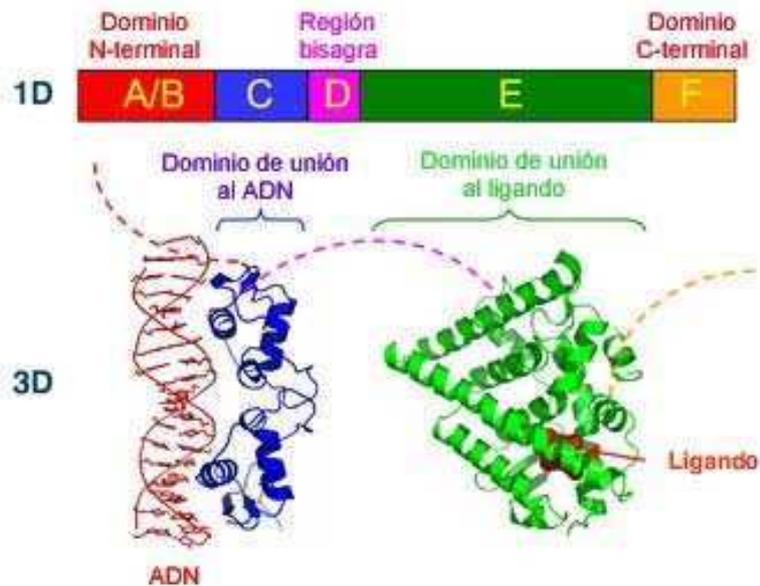


Figura 16. Se observan en 1 dimensión o en 3 dimensiones los dominios estructurales y funcionales de la familia de PPARs esquema adaptado de MedLibrary.org.

Cabe destacar que existe una acción diferencial de los distintos ligandos de cada isoforma de PPAR, ya que varían los coactivadores que se reclutan en presencia de diferentes agonistas de mismo receptor (Hostetler y col. 2005; Desvergne y col. 2006).

Si bien la unión a PPRE constituye el clásico mecanismo de acción de PPARs, se han descrito otros mecanismos no genómicos, como por ejemplo aquellos en los que PPAR α y PPAR γ pueden interferir directamente con NF κ B y AP-1 a través de interacciones directas proteína-proteína (Delerive y col. 1999) o como el mecanismo de transrepresión de PPAR γ por secuestro de activadores que interfiere con las vías de acción de NF κ B, AP-1 y STAT-1 resultando en la represión del promotor de iNOS (Li y col. 2000).

Entre las modificaciones post-traduccionales que regulan la actividad de los PPARs podemos mencionar 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 y col. 1999). También la degradación de los PPARs es regulada por su ubiquitinización, las tiazolidinedionas son capaces de inducir la ubiquitinización de PPAR γ , y subsecuentemente la degradación por proteosomas del mismo (Hauser y col. 2000), por otro lado, los fibratos

inhiben la ubiquitinización de PPAR α y de esta manera incrementan su vida media (Hirotsu y col. 2001; Blanquart y col. 2002). Otro mecanismo de regulación post-transcripcional es la sumoilación (adición de pequeñas proteínas similares a la ubiquitina) que puede tener efectos inhibitorios en la actividad del receptor o bien inducir transrepresión. La sumoilación de PPAR γ induce su localización en promotores de genes inflamatorios en asociación con co-represores (Pascual y col. 2005).

Los genes blanco de los PPARs se encuentran involucrados en muchos procesos biológicos, como la regulación del ciclo y de la diferenciación celular, de procesos inflamatorios, de apoptosis, de la homeostasis lipídica, entre otros (Desvergne y Wahli 1999; Francis y col. 2003; Mandard y col. 2004).

Función biológica de los PPARs

El nombre PPAR proviene de la observación de que su activación incrementaba la densidad, volumen y proliferación de los peroxisomas de los hepatocitos (Issemann y Green 1990), este PPAR fue denominado PPAR α . Poco después, PPAR δ y PPAR γ fueron identificados por compartir una significativa homología de secuencia con PPAR α (Xu y col. 2001), pero estos últimos no están involucrados en la proliferación de los peroxisomas. Finalmente, se descubrió que estos receptores estaban involucrados en diferentes procesos biológicos.

Si bien inicialmente se había descrito a los PPARs como receptores huérfanos, hoy en día se conocen múltiples ligandos endógenos. Los agonistas de PPARs son moléculas lipídicas entre las que se encuentran ligandos compartidos para los tres PPARs (mayormente ácidos grasos mono y poliinsaturados) y ligandos particulares para cada uno de los isotipos (mayormente eicosanoides) (Figura 16). La presencia de varios ligandos endógenos que pueden activar a un mismo isotipo de PPAR es característico de estos receptores nucleares y se debe al particular sitio de unión al ligando que posee una larga cavidad hidrofóbica en relación a los otros receptores nucleares de la misma familia, lo cual le permite acomodar a diversos tipos de moléculas lipídicas (Xu y col. 1999). Por otro lado, se han descrito varios agonistas farmacológicos con potentes acciones

hipolipemiantes e insulino sensibilizantes, muchos de los cuales se utilizaban incluso antes de haberse identificado a los PPARs (Beaven y Tontonoz 2006).

PPAR α cumple un importante rol en el catabolismo lipídico, regulando la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la captación de ácidos grasos, la β -oxidación de los mismos y el tráfico de colesterol (Li y col. 2002). Se ha observado que también posee efectos antiinflamatorios (Youssef y Badr 2004).

Se distribuye mayormente en tejidos con alta tasa metabólica como el hígado, corazón, músculo esquelético y riñón, expresándose también en otros tejidos como la placenta y la glándula adrenal (Braissant y col. 1996).

PPAR α puede ser activado por ácidos grasos de cadena larga (como el ácido araquidónico, ácido linoleico, ácido docosahexaenoico, ácido eicosaenoico) y por eicosanoides como HETE y el leucotrieno B₄ (LTB₄) (Forman y col. 1997; Lin y col. 1999; Hihi y col. 2002) (Figura 16). Ciertos ácidos grasos mono y poliinsaturados son también ligandos de PPARs, no así los ácidos grasos saturados aunque podrían también activarlos a través de su metabolito ácido graso-coenzima A (Banner y col. 1993; Hostetler y col. 2005). 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 y col. 2004).

De forma interesante, recientemente se ha observado que PPAR α tendría un rol en ciertas diferencias metabólicas género-dependientes en el hígado, por ejemplo se ha observado que la sumoilación de PPAR α media la represión específica de genes en hembras y protege al hígado de la toxicidad inducida por estrógenos en ratones (Leuenberger y col. 2009).

Ratones knockout para el gen PPAR α presentan una respuesta inflamatoria prolongada (Devchand y col. 1996) y existe evidencia que sugiere que PPAR α es capaz de regular los niveles plasmáticos de lipoperóxidos (Inoue y col. 1997) y la administración de benzafibrato (agonista de PPAR α) reduce los niveles circulantes de lipoperóxidos (Inoue y col. 1998). Se ha reportado que la activación de este receptor nuclear está involucrada en respuestas antiinflamatorias, agonistas de PPAR α inhiben la actividad transcripcional de NF- κ B, AP-1, GATA y NFAT (factor nuclear de células T activadas) que median la inducción de genes responsables del desarrollo de

inflamación vascular (Delerive y col. 1999). Además, se ha demostrado que los agonistas de PPAR α reducen la producción de NO incrementando la degradación de la iNOS en macrófagos murinos (Paukkeri y col. 2007).

PPAR δ está involucrado en diversos procesos de diferenciación y proliferación celular, es un regulador de la homeostasis energética y también posee propiedades antiinflamatorias (Matsuura y col. 1999; Fredenrich y Grimaldi 2005; Moraes y col. 2006).

Su expresión es ubicua en todos los tejidos murinos y humanos testeados con diferencias en los niveles de expresión dependiente del tipo celular (Higashiyama y col. 2007). Los ligandos de PPAR δ son la PGI $_2$, así como también varios ácidos grasos insaturados como el ácido araquidónico, el ácido linoleico y ácido oleico, entre otros (Forman y col. 1997) (Figura 16). Los fármacos desarrollados, carbaprostaciclina e iloprost, son mayormente utilizados como mimetizantes de la acción de PGI $_2$ y poseen acción tanto a nivel del receptor de membrana para PGI $_2$ como actividad PPAR δ (Kersten y Wahli 2000).

Mientras algunas de las funciones de PPAR δ se encuentran aún bajo estudio, otras funciones de este receptor han sido bien documentadas, por ejemplo el rol en la mielinización cerebral en la reabsorción ósea por osteoclastos (Mano y col. 2000; Peters y col. 2000). Su implicancia en el metabolismo lipídico comprende la expansión clonal de preadipocitos, la oxidación de ácidos grasos en tejido muscular y la homeostasis de lipoproteínas (Hansen y col. 2001; Oliver y col. 2001; Schuler y col. 2006).

PPAR δ se encuentra involucrado en crecimiento celular, su expresión se encuentra incrementada en células de cáncer colorrectal (Gupta y col. 2000) y también se encuentra implicado en el crecimiento de otros tipos celulares como las células del músculo liso vascular y células epiteliales (Zhang y col. 2002; Burdick y col. 2006).

PPAR δ tiene un rol clave en la diferenciación y proliferación de keratinocitos y es un regulador importante de la supervivencia de los mismos durante el daño epitelial y también se encuentra involucrado en la adhesión y migración de células epiteliales (Tan y col. 2001; Michalik y Wahli 2007).

PPAR γ promueve el almacenamiento de lípidos en tejido adiposo y la diferenciación de adipositos (Tontonoz y col. 1994), posee tres isoformas

(PPAR γ 1, γ 2 y γ 3) que se expresan principalmente en el tejido adiposo marrón y blanco (Leone y col. 1999; Rosen y Spiegelman 2000). También se expresan 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 y col. 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 (Rosen y col. 1999; Rizzo y Fiorucci 2006).

PPAR γ es activado por prostaglandinas derivadas de la PGD₂ y se ha demostrado que su metabolito final, la 15dPGJ₂, se une directamente al dominio de unión al ligando y activa PPAR γ (Forman y col. 1995; Desmarais y col. 2007). Los eicosanoides 9-HODE, 13-HODE y 15-HETE, han sido identificados como ligandos de PPAR γ (Nagy y col. 1998; Tontonoz y col. 1998). También los ácidos grasos insaturados son activadores de PPAR γ (Hihi y col. 2002). PPAR γ fue identificado como un blanco molecular para las tiazolidinedionas o glitazonas (Lehmann y col. 1995), agentes insulino-sensibilizantes utilizados hoy en día en la práctica clínica para el tratamiento de la diabetes tipo 2 (Figura 16).

Son numerosos los reportes que demuestran propiedades antiinflamatorias para PPAR γ . En macrófagos activados, las respuestas de los factores de transcripción AP-1, NF κ B y STAT1, pueden ser reprimidas por 15dPGJ₂ solamente en presencia de PPAR γ , resultando en la inhibición de la expresión de la enzima iNOS, MMP9 y receptor scavenger A (Ricote y col. 1998). También se ha demostrado que en monocitos, la producción de citoquinas inflamatorias es inhibida por los agonistas de PPAR γ como la 15dPGJ₂ y las glitazonas (Jiang y col. 1998). 15dPGJ₂ bloquea la expresión de iNOS y la subsecuente producción de NO en células mesangiales a través de mecanismos mediados por PPAR γ , interfiriendo con la actividad transcripcional de NF κ B o también por mecanismos independientes de NF κ B (Oates y col. 2002).

Recientemente se ha descubierto un rol de PPAR γ en la diferenciación de osteoclastos y en la reabsorción ósea cuando es activado por rosiglitazona (Wahli 2008).

Dado que los ácidos grasos son agonistas de los tres isotipos de PPARs, algunos trabajos han estudiado, de forma interesante, el efecto de la administración dietaria de ácidos grasos (Bordoni y col. 2006). Estudios en ratas alimentadas con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados muestran incrementos en la expresión de genes blanco para PPAR α en el tejido cardíaco (Okere y col. 2006) y una dieta enriquecida con aceite de cártamo (contiene ácido linoleico, agonista de PPARs) administrada a ratas muestra cambios en genes hepáticos que son regulados por PPARs (Hsu y Huang 2006). Trabajos de nuestro laboratorio muestran que dietas ricas en aceite de cártamo y aceite de oliva (rica en ácido oleico) regulan el metabolismo de los lípidos placentarios y fetales de ratas sanas y diabéticas (Capobianco y col. 2008; Capobianco y col. 2008).

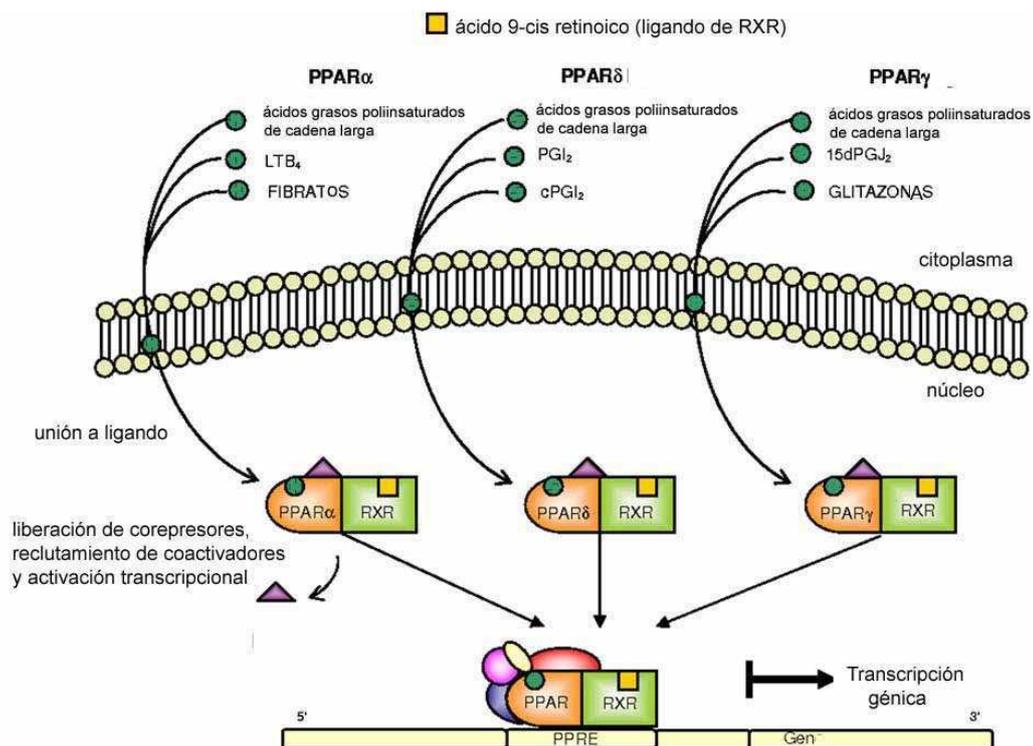


Figura 16. Esquema de las principales vías de activación de los PPARs. PPARs activan la transcripción de genes luego de heterodimerizar con el receptor de ácido retinoico (RXR) cuyo ligando es el ácido 9-cis retinoico. Los ligandos de PPARs pueden provenir del citoplasma o sintetizarse en la membrana nuclear. La unión al ligando induce un cambio conformacional en el PPAR que permite su disociación de factores represores y el reclutamiento de factores activadores que permiten la transcripción génica. Los heterodímeros PPAR-RXR se unen a regiones específicas de ADN denominadas elementos de respuesta a PPARs (PPREs) localizadas en el promotor de genes blanco. Esquema adaptado de Jawerbaum y Capobianco 2010.

Participación de los PPARs en los procesos reproductivos

Los tres isotipos de PPARs poseen funciones reproductivas. La expresión de PPARs se ha observado tanto en el ovario como en el útero (Lim y col. 1999; Komar y col. 2001).

En el ovario, PPAR γ se expresa fuertemente en las células de la granulosa y de forma más débil en las células tecales donde se observa la expresión de PPAR δ y PPAR α (Komar y col. 2001).

Se observa una alta expresión de PPAR α y PPAR δ en el estadio de 2 células embrionarias en ratón y la expresión de estos receptores disminuye progresivamente en el embrión de 8 células y se reduce aún más en el blastocisto (Kim y col. 2011). Durante el desarrollo embrionario, puede observarse la transcripción de PPAR δ en el embrión en etapa de organogénesis siendo la intensidad de la expresión dependiente del tejido y estadio en cuestión (Braissant y Wahli 1998). Estudios de PPAR δ durante el desarrollo muestran que en estadios fetales más avanzados su expresión es ubicua observándose en el pulmón, corazón, riñón, hígado y tracto gastrointestinal. Mientras que en el embrión organogénico PPAR δ se expresa en el sistema nervioso central, en el primer arco branquial y la protuberancia del tracto digestivo (Braissant y Wahli 1998; Keller y col. 2000; Abbott 2009). Es interesante que ratones KO de PPAR δ muestren alteraciones en la diferenciación adipositaria y en la mielinización (Peters y col. 2000) indicando que este receptor es necesario para la homeostasis lipídica y para un correcto desarrollo neuronal.

La expresión de PPAR γ y PPAR α comienza en el feto en el estadio de postplacentación y se encuentra en los mismos tejidos donde se expresarán en el adulto (Braissant y Wahli 1998). PPAR α se expresa en hígado, riñón, intestino, corazón, músculo esquelético, glándula adrenal, páncreas y sistema nervioso central. La activación fetal de PPAR α regula el peso del feto y del hígado fetal (Martinez y col. 2010). La expresión de PPAR γ es elevada en el tejido adiposo marrón (día 18.5 de gestación) y en el sistema nervioso central (del día 13.5 al día 15.5 de gestación de rata) respecto a otros tejidos (Braissant y Wahli 1998).

Un patrón de expresión similar de los tres isotipos de PPARs se ha descrito recientemente en tejidos fetales humanos (Abbott y col. 2010).

Los ratones knockout para PPAR α tienen una tasa incrementada de aborto y la descendencia viable presenta acumulación lipídica hepática, obesidad y una respuesta inflamatoria prolongada (Kersten y col. 1999; Yessoufou y col. 2006). De forma diferente, la delección de PPAR δ y PPAR γ es mayoritariamente letal como resultado de defectos tanto en el desarrollo del embrión como también de la placenta (Barak y col. 1999; Barak y col. 2002). La descendencia PPAR γ -/- muere antes del nacimiento debido a la falta de tejido adiposo, mientras que la descendencia viable PPAR δ -/- presenta una fertilidad disminuida y una reducción del tejido graso abdominal (Barak y col. 1999; Peters y col. 2000; Barak y col. 2002). La progenie de los ratones PPAR δ -/- presenta retardo de crecimiento, alteraciones en el desarrollo neuronal y anomalías en la proliferación de células epidérmicas (Peters y col. 2000; Barak y col. 2002).

PPAR δ se expresa en el útero durante el proceso de implantación embrionaria mediando la acción de la PGI $_2$, prostaglandina que cumple un rol fundamental durante esta etapa (Lim y col. 1999). En efecto, en los ratones PPAR δ -/- se observan alteraciones en la implantación, decidualización y placentación (Wang y col. 2007).

Los tres isotipos de PPARs se encuentran presentes en las células trofoblásticas y ejercen funciones críticas en el desarrollo y la función de la placenta (Barak y col. 2008).

PPAR α se expresa 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 y col. 2002). Sin embargo, ratones deficientes en PPAR α , son igualmente fértiles (DeLuca y col. 2000). Se postula su función en la regulación de la transferencia lipídica materno-fetal, y en la utilización de lípidos placentarios y fetales (Martinez y col. 2007; Xu y col. 2007).

Los ratones PPAR δ -/- poseen alteraciones morfológicas en la placentas como una pérdida del contacto placento-decidual, posiblemente relacionado con un desbalance en la remodelación de la matriz extracelular (Barak y col. 2002; Wang y col. 2007). Estos ratones también presentan anomalías en la angiogénesis durante la formación de la placenta observándose alteraciones en la expresión de COX-2, el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y MMP2 (Wang y col. 2007).

PPAR γ está involucrado en la diferenciación y maduración de los trofoblastos (Barak y col. 1999). En ratones PPAR γ -/- se encuentra afectada la expresión de la proteína Mucin 1 (MUC1), cuyo gen es blanco de este receptor nuclear. MUC1 se expresa en la superficie apical de la zona del laberinto placentario y ayuda a la diferenciación de las células madre trofoblásticas (Shalom-Barak y col. 2004). Además, son varios los estudios que muestran que la activación de PPAR γ reprime la invasión de los trofoblastos extravellosidad humanos (Tarrade y col. 2001). Su activación 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 reservados para el desarrollo fetal (Capobianco y col. 2005).

Es interesante destacar la capacidad de los agonistas de PPARs de regular la respuesta inflamatoria en células trofoblásticas y amnióticas en cultivo. Por ejemplo, ligandos de PPAR γ endógenos (15dPGJ₂) y sintéticos (troglitazona) antagonizan la elevada actividad NF κ B inducida por LPS, y reducen la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α), y de las enzima COX-2 y MMPs en tejidos gestacionales humanos (Lappas y col. 2002; Lappas y col. 2006). Estudios realizados en cultivos de células amnióticas también muestran que agonistas de PPARs inhiben la expresión de COX-2 y la síntesis de PGE₂ (Ackerman y col. 2005; Berry y col. 2005).

La expresión de PPAR γ , PPAR δ y PPAR α se ha encontrado en tejidos gestacionales humanos a término, como el amnios, la coriodecidua y la placenta (Marvin y col. 2000; Berry y col. 2003).

Los niveles de PPAR α y PPAR δ , se incrementan en la placenta a término (Berry y col. 2003), mientras que los niveles de PPAR γ disminuyen, probablemente debido a su capacidad de inhibir la formación de prostaglandinas, altamente requeridas durante el proceso de parto, ya que en forma simultánea se observan incrementos en la expresión de COX-2 (Dunn-Albanese y col. 2004).

PPARs en la gestación diabética

El sistema PPAR regula el metabolismo y las vías involucradas en el establecimiento de la diabetes gestacional. Como se ha descrito anteriormente, agonistas de PPARs tienen efectos hipolipidémicos,

antidiabetogénicos, antiinflamatorios y antioxidantes, que son todos benéficos en el tratamiento de la diabetes (Berger y Moller 2002).

Los factores ambientales, como la dieta, el ejercicio y factores genéticos influyen en la actividad de PPAR α y PPAR γ , así como también sobre el riesgo de padecer insulino resistencia y diabetes gestacional (Morifuji y col. 2006).

Ratones PPAR α -/- son hipoinsulinémicos y poseen una reducida habilidad para utilizar glucosa y lípidos como fuente de energía (Yessoufou y col. 2006).

Entre los genes candidatos para el riesgo de diabetes gestacional, están el de PPAR α y el de PPAR γ . Sin embargo, si bien se estudiaron algunos polimorfismos encontrados en estos genes, aún no se han podido relacionar en forma directa con el desarrollo de la diabetes gestacional (Leipold y col. 2006; Tok y col. 2006).

En embriones de ratas diabéticas se ha observado que la expresión de PPAR δ y los niveles de los ligandos endógenos de PPAR δ y de PPAR γ , la PGI $_2$ y la 15dPGJ $_2$, están reducidos; mientras que PPAR δ regula la síntesis de fosfolípidos y de PGE $_2$, necesaria durante el proceso de cierre de tubo neural, la 15dPGJ $_2$ posee funciones reguladoras del metabolismo lipídico y la homeostasis nitridérgica en embriones en esta etapa del desarrollo (Jawerbaum y col. 2002; Higa y col. 2007).

La concentración de 15dPGJ $_2$ se encuentra reducida en fetos de ratas diabéticas a mediados de la gestación, si bien se incrementa la concentración de PPAR γ fetal (Pustovrh y col. 2009). Además, se destaca la capacidad de 15dPGJ $_2$ para prevenir la sobreproducción de NO y MMPs en fetos provenientes de ratas diabéticas (Pustovrh y col. 2009).

Agonistas de PPAR α son potentes reguladores de la masa y síntesis de lípidos en fetos de ratas diabéticas en donde se observó una sobreacumulación lipídica y un incremento en la biosíntesis de varias especies de lípidos (Martinez y col. 2008). En el hígado y el corazón de fetos de ratas diabéticas se observaron alteraciones en la expresión de PPAR α (Lindegaard y Nielsen 2008; Martinez y col. 2010). Los agonistas de PPAR α previenen la sobreacumulación y la peroxidación lipídica en el hígado fetal de ratas diabéticas (Martinez y col. 2010).

En el período de post-placentación, se observó un incremento en la deposición de lípidos y una disminución en la síntesis de los mismos se

encontró en placentas de ratas diabéticas a las que se les administró un tratamiento dietario con agonistas de PPARs (Capobianco y col. 2008). En estas placentas se observó además que la activación de PPAR α regula negativamente la masa y síntesis de lípidos y que existe una disminución en la concentración de LTB $_4$, ligando endógeno de PPAR α (Martinez y col. 2008).

Las concentraciones de PPARs se encuentran alteradas en la placenta humana en diferentes enfermedades gestacionales, incluyendo la diabetes mellitus (Wieser y col. 2008). En placentas a término de mujeres con diabetes gestacional, los niveles de PPAR α y PPAR γ se encuentran disminuidos mientras que no se observan cambios en los niveles de PPAR δ (Holdsworth-Carson y col. 2010). Por el contrario, no se han observado cambios en los niveles de PPAR γ en las placentas provenientes de mujeres con diabetes tipo 1 aunque es importante la reducción de los niveles de 15dPGJ $_2$ (Jawerbaum y col. 2004).

La expresión de PPAR γ y PPAR α , pero no de PPAR δ se encuentra reducida en placentas de ratas diabéticas a término (Capobianco y col. 2005; Kurtz y col. 2010). De forma interesante, estos cambios son dependientes de la edad gestacional, dado que PPAR α y PPAR γ se encuentran incrementados en placentas de ratas diabéticas en periodo de post-placentación (Suwaki y col. 2007; Martinez y col. 2008).

La activación de PPAR γ mediante 15dPGJ $_2$ modula negativamente la producción de NO y la sobreactivación de MMPs en placentas de ratas diabéticas tanto a mediados de la gestación como a término y en la placenta de mujeres con diabetes (Jawerbaum y col. 2004; Capobianco y col. 2005; Pustovrh y col. 2009).

En cuanto a PPAR δ , se ha observado que su activación regula la síntesis, la oxidación y lipoperoxidación de lípidos en la placenta de rata diabética a término (Kurtz y col. 2010).

Ácido Fólico

Metabolismo del ácido fólico

El ácido fólico es una vitamina hidrosoluble, su nombre deriva del latín folium (hoja). Su descubrimiento data de 1930 como un factor que corregía la anemia macrocística en embarazadas. Su composición química involucra un anillo de pteridina, el ácido p-aminobenzoico y moléculas de glutamato (Figura 17).

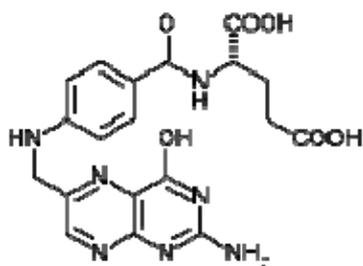


Figura 17. Estructura química del ácido fólico.

El ácido fólico se refiere a la forma oxidada del compuesto químico que no se encuentra disponible en alimentos. El término folato se refiere al grupo de compuestos que tienen la misma actividad química, incluyendo de esta manera tanto al ácido fólico como a los folatos que se obtienen de forma natural.

El folato es utilizado entre otras por algunas reacciones del metabolismo de los aminoácidos, la síntesis de purinas y pirimidinas y la formación del sustrato para las reacciones de metilación.

La forma activa del ácido fólico es el 5-metiltetrahidrofolato, la conversión de este compuesto a 5,10-metiltetrahidrofolato utiliza carbonos provenientes de la serina principalmente. El 5,10-metiltetrahidrofolato es utilizado directamente para la síntesis de purinas y pirimidinas (Bailey y Gregory 1999) (Figura 18).

El ciclo del ácido fólico participa en la síntesis de metionina a partir de homocisteína. La metionina es convertida a s-adenosilmetionina que actúa como cofactor de varias reacciones de metilación incluyendo la metilación del ADN, ARN, proteínas y lípidos. La transferencia de grupos metilo ocurre en el pasaje de s-adenosilmetionina a s-adenosilhomocisteína (Bailey y Gregory 1999; Stover 2004) (Figura 18).

Debido a su función, la deficiencia de folato en células que se encuentran realizando una rápida división puede dar lugar a alteraciones en la síntesis de ADN y aberraciones cromosómicas (Heath 1966). La hipometilación del ADN induce una expresión génica anormal (Wainfan y Poirier 1992; Pogribny y col. 1997).

En el metabolismo de los aminoácidos el folato participa mediando la interconversión de serina y glicina y se encuentra involucrado en el catabolismo de la histidina (Bailey y Gregory 1999) (Figura 19).

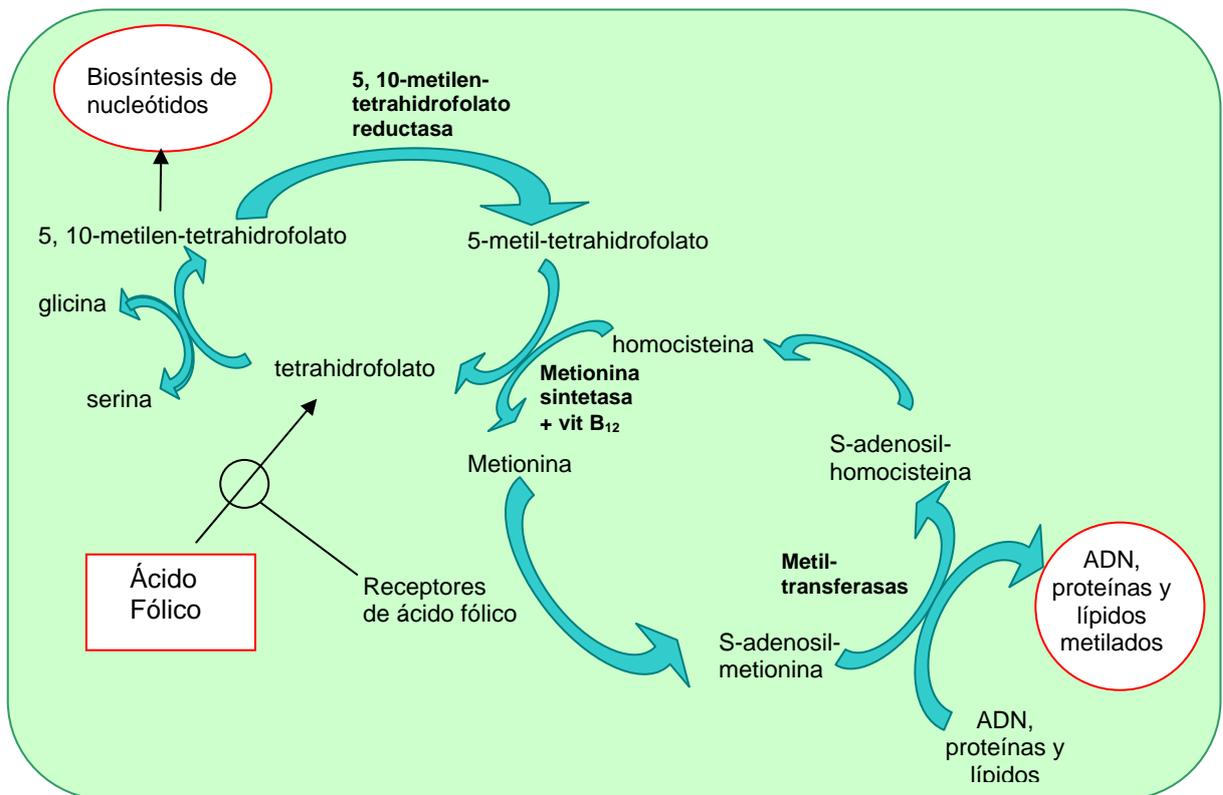


Figura 18. Metabolismo del ácido fólico.

De esta manera, la formación de toda nueva célula depende de un adecuado suministro de folatos.

Dado que el ácido fólico es esencial para el crecimiento y diferenciación celular, es esencial para el desarrollo fetal. El transporte de ácido fólico hacia el feto se produce mediante los receptores de folato, Folbp, que se expresan en gran cantidad en el oocito, oviducto, células uterinas y en el embrión, especialmente en los pliegues neurales previamente al cierre del tubo neural (Rosenquist y Finnell 2001; da Costa y col. 2003). Se ha observado que anticuerpos que se unen a los receptores de

folato causan daño embrionario (da Costa y col. 2003). Durante la embriogénesis y el desarrollo fetal, son mayores los requerimientos de folato maternos para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas para la formación de nuevas células. Dado que las células embrionarias se encuentran dividiéndose rápidamente durante la embriogénesis, son las más susceptibles a irregularidades en la síntesis de ADN y la deficiencia de folato podría dar lugar a alteraciones en la proliferación celular y en la metilación de lípidos, proteínas y mielina (Locksmith y Duff 1998).

Por esto es que la deficiencia de folato o alteraciones en su metabolismo es un mecanismo propuesto como causante de malformaciones congénitas (Goh y Koren 2008).

Se prescribe la ingesta de ácido fólico en el período periconcepcional a fin de prevenir la dismorfogénesis embrionaria en la población general (400-800 μg diarios desde 4 semanas antes de la concepción y hasta 12 semanas después de la concepción).

El folato posee propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Regula el desacoplamiento de la NOS induciéndola a producir NO en detrimento de anión superóxido y el mecanismo de acción involucra la regulación de la oxidación de la tetrahydropterina (BH_4), cofactor necesario para la producción de NO por la NOS por el 5-metiltetrahydrofolato (Stroes y col. 2000). El 5-metiltetrahydrofolato es capaz de capturar el O_2^- en solución a pesar de que las cantidades de folatos requeridas son superiores a las fisiológicas (Stroes y col. 2000). El 5-metiltetrahydrofolato tiene un efecto protector en la oxidación del LDL (Nakano y col. 2001) y tiene la capacidad de captar peroxinitritos in vitro (Rezk y col. 2003). De hecho, la deficiencia de ácido fólico en la dieta provoca alteraciones en los niveles de vitaminas antioxidantes (Henning y col. 1997).

Además de encontrarse involucradas las alteraciones del metabolismo del ácido fólico en la formación de malformaciones congénitas, en ratones hembras preñadas y alimentadas con dietas deficientes en folato o con deficiencias en la enzima metilentetrahydrofolato, se observan altas tasas de reabsorciones y retardo en el crecimiento embrionario (Li y col. 2005). De forma interesante, en un trabajo reciente, se ha determinado un posible rol del folato en la regulación de la invasión trofoblástica durante el desarrollo placentario. En cultivos de explantos placentarios a los que se les

adicionó ácido fólico, se observó un incremento en la invasión del trofoblasto extravascular que correlaciona con un incremento en la secreción de MMPs y un aumento en la proliferación celular, mientras que se encontró una disminución en la apoptosis (Williams y col. 2011).

Por otro lado, se observó que la suplementación con ácido fólico mejora funciones cognitivas previniendo enfermedades como Alzheimer, depresión y demencia; entre los mecanismos de acción del folato propuestos se encuentran el incremento de ácidos grasos poliinsaturados n-3 como los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico y la regulación de la síntesis de NO (Das 2008).

Participación del ácido fólico en la patología diabética

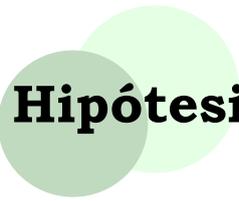
Como se mencionó anteriormente, el ácido fólico participa en la síntesis de metionina a partir de homocisteína, por lo que su carencia se encuentra estrechamente vinculada con altos niveles de homocisteína en circulación. Altos niveles de homocisteína reflejan una alteración en muchos procesos vitales de la célula, con consecuencias adversas para los tejidos. Se considera que la hiperhomocisteinemia es un factor de riesgo independiente para la arteriosclerosis, el síndrome metabólico y las complicaciones de la diabetes, entre otras enfermedades (Hayden y Tyagi 2004). De hecho, valores séricos disminuidos de ácido fólico se han observado en individuos con diabetes (Giannattasio y col. 2010).

Se observó en ratas diabéticas preñadas que la suplementación con ácido fólico disminuye las malformaciones embrionarias y normaliza el desarrollo alterado de los embriones cultivados *in vitro* con alta glucosa (Wentzel y col. 2005). También en ratones, se ha mostrado que el ácido fólico previene los defectos de tubo neural, las malformaciones cardiovasculares y esqueléticas inducidas por la diabetes (Oyama y col. 2009).

El ácido fólico tendría también propiedades anti-apoptóticas. El tratamiento con ácido fólico incrementa la expresión proteica de Bcl-2 en embriones en etapa de organogénesis temprana de ratas diabéticas en donde dicha proteína antiapoptótica se encontraba reducida (Gareskog y col. 2006). Con la administración de folato también disminuye la tasa de apoptosis en los sacos vitelinos de ratas diabéticas. En estos sacos vitelinos

se observa que se normaliza la morfología vascular, incrementándose los niveles de VEGF-A (Zabihi y col. 2007).

Los estudios poblacionales indican el amplio beneficio de la suplementación de folatos en la reducción del índice de malformaciones congénitas en la población general, y se aconseja su ingesta en mayores concentraciones (5 mg) en mujeres con antecedentes de malformaciones congénitas y en poblaciones de riesgo de inducción de malformaciones congénitas como las mujeres diabéticas gestantes, si bien no hay estudios específicos que hayan evaluado el efecto de la suplementación con ácido fólico en embarazadas con diabetes (CDC U.S. Department of Health 1992; SAD 2010).



Hipótesis general

La diabetes materna induce un incremento en la tasa de malformaciones embrionarias, inducción que se relaciona con alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico, en la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y en la actividad de las MMPs y TIMPs en el embrión y la decidua de rata. Agonistas de los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) y/o el ácido fólico modulan las vías metabólicas y enzimáticas mencionadas en el embrión y la decidua de rata sana y diabética.

Hipótesis de Trabajo

- La diabetes materna induce alteraciones en el metabolismo del ácido araquidónico, en la producción de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y en la actividad de las MMPs y TIMPs en los embriones y deciduas que se vinculan a un incremento en la tasa de malformación embrionaria durante el período de organogénesis temprana.
- El tratamiento dietario materno con aceites enriquecidos en ácidos grasos agonistas de PPARs modula la producción de prostaglandinas y de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno, y la actividad de las MMPs y TIMPs en los embriones y deciduas durante el periodo de organogénesis temprana en la rata. En la patología diabética, dicho tratamiento contribuye a prevenir en el embrión y la decidua alteraciones en la producción de prostaglandinas y de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y las anomalías en la actividad de las MMPs y TIMPs que induce esta patología.
- El tratamiento con ácido fólico modula la producción de las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno y la actividad de las MMPs y TIMPs en el embrión y la decidua de rata. En la patología diabética, dicho tratamiento previene en el embrión y la decidua el estrés oxidativo y nitrosativo y las alteraciones en la actividad de MMPs y de TIMPs que induce esta patología.



Objetivos específicos

- 1) Evaluar en las ratas sanas y con diabetes :
 - Parámetros de crecimiento embrionario, tasa de reabsorción y malformación embrionaria.
- 2) Evaluar en el tejido embrionario y decidual de ratas sanas y con diabetes :
 - Los niveles de PPAR α , PPAR γ y PPAR δ .
 - Los niveles de PGI $_2$.
 - Los niveles de PGE $_2$.
 - Los niveles de TXA $_2$.
 - La producción de óxido nítrico.
 - La peroxidación lipídica.
 - El daño inducido por peroxinitritos.
 - La actividad y expresión de las MMPs.
 - La actividad inhibitoria y expresión de los TIMPs.
 - El balance MMPs/TIMPs *in situ*.
- 3) Evaluar en las ratas sanas y con diabetes el efecto de tratamientos dietarios ricos en ácidos grasos agonistas de PPARs sobre:
 - Parámetros de crecimiento embrionario, tasa de reabsorción y malformación embrionaria.
- 4) Evaluar en los embriones y las deciduas de ratas sanas y con diabetes el efecto de tratamientos dietarios ricos en ácidos grasos agonistas de PPARs sobre:
 - Los niveles de PGI $_2$.

- Los niveles de PGE₂.
- La producción de óxido nítrico.
- La peroxidación lipídica.
- La actividad y expresión de las MMPs.
- La actividad inhibitoria de los TIMPs.

5) Evaluar en las ratas sanas y con diabetes el efecto del ácido fólico y del ácido fólico administrado junto a una dieta suplementada en aceite de cártamo, agonista de PPARs sobre:

- Parámetros de crecimiento embrionario, tasa de reabsorción y malformación embrionaria.

6) Evaluar en las ratas sanas y con diabetes el efecto del ácido fólico y del ácido fólico administrado junto a una dieta suplementada en aceite de cártamo, agonista de PPARs sobre:

- La producción de óxido nítrico.
- La peroxidación lipídica.
- La actividad y expresión de las MMPs.
- La actividad inhibitoria de los TIMPs.
- El balance MMPs/TIMPs *in situ*.



Materiales y métodos

Materiales

Equipos de determinación colorimétrica

Nitratos y nitritos (CAYMAN)

Determinación de 6-ceto PGF_{1α} (CAYMAN)

Determinación de isoprostanos (CAYMAN)

Determinación de TXB₂ (CAYMAN)

Sales

NaCl, NaHCO₃, MgSO₄, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, ClK, MgCl₂, CaCl₂, Na₂CO₃, Glucosa, NaHCO₃, ZnCl₂ (SIGMA, MALLINKRODT, CICARELLI, ANEDRA, PROMEGA o BAKER).

Solventes

Ácido acético, glicerol, xilol, etanol absoluto, metanol, formaldehído, acetona, éter etílico, cloroformo, hexano, ácido trifluoroacético (ANEDRA, BIOPACK, MERCK, SINTORGAN o CICARELLI).

Drogas y reactivos

Acrilamida, N' N' bis-metil-acrilamida, glicina, dodecilsulfato de sodio (SDS), tris (hidroximetil)-aminometano (Tris), N',N',N',N', azul de coomasie R-250, reactivo de Bradford, azul de bromofenol y glicina (BIORAD).

Rojo Ponceau S, tetrametilenetilendiamina (TEMED), ácido tiobarbitúrico (TBA), malonildialdehído (1,1,3,3) tetraetoxipropano (MDA), 3,3' diamino-

benzidina (DAB), seroalbumina bovina (BSA), tetra acetato de etieldiamina. (EDTA), PGE₂, estreptozotocina, buffer citrato, ácido fólico (SIGMA). Ácido tricloro acético (TCA) (J. T. BAKER), peróxido de hidrógeno (MALLINCKRODT), persulfato de amonio y β-Mercaptoetanol (PROMEGA), [³H]-PGE₂ (New England Nuclear Dupont).

Anticuerpos

Anticuerpos primarios	Tipo	Origen
PPAR α	policlonal	Cayman
PPAR δ	policlonal	Santa cruz
PPAR γ	policlonal	Santa cruz
MMP9	monoclonal	Calbiochem
MMP2	monoclonal	Calbiochem
TIMP1	policlonal	Calbiochem
TIMP2	monoclonal	Calbiochem
TIMP3	policlonal	Santa cruz
Nitrotirosina	monoclonal	Calbiochem
α -actina	monoclonal	Sigma

Anticuerpos secundarios	origen
Anti- IgG de conejo conjugado con la enzima peroxidasa de rábano	Jackson ImmunoResearch
Anti- IgG de ratón conjugado con la enzima peroxidasa de rábano	Jackson ImmunoResearch
Anti- IgG de conejo biotinilado.	Vector Laboratories
Anti- IgG de ratón preabsorbido en rata biotinilado.	Vector Laboratories
Anti- IgG de cabra biotinilado.	Vector Laboratories

También se utilizaron suero normal de caballo y suero normal de cabra (Vector Laboratories).

Otros

Portaobjetos para inmunohistoquímica y para montaje de cortes de crióstato (TNT), medio de montaje para crióstato cryoplast (BIOPACK), gelatina DQ fluorescente (Molecular Probes, INVITROGEN), lector Accu Check para determinación de glucemias y tiras de determinación de glucemia (ROCHE), marcadores de peso molecular preteñidos (Invitrogen), parafina (PARAPLAST), hematoxilina (BIOPUR), Tritón X-100 (ROHM & HAAS) y Tween-20 (MERCK), membranas de nitrocelulosa y kit ECL de quimioluminiscencia para revelado de western blot (GE Healthcare), medio condicionado de células de fibrosarcoma humano HT-1080 (Laboratorio de Investigación del Cáncer, CEFYBO, Argentina), lápiz hidrofóbico (DAKO), kit de revelado con el complejo avidina-biotina (Vector Laboratories), soluciones fijadoras de tejido: HOPE I y II, pegamento fijador de cobre-objetos: Entellan y cóctel inhibidor de proteasas (SIGMA), aceite de cártamo (BUNGE CEVAL S.A.), aceite de oliva (SAN JUAN DE LOS OLIVOS).

Programas de análisis de imagen

Image J, Image ProPlus

Programas de análisis estadístico

Graphpad instat 3, Graphpad prism 4.

Animales

Ratas hembra de la cepa Wistar fueron adquiridas en el Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y 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 14 y 10 horas respectivamente, la temperatura de 22 °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 \(NIH\)](#) especificadas en “Principles of Laboratory Animal Care, NIH publication N° 85-23, revised 1985”.

Métodos

Modelo experimental de diabetes

Las hembras diabéticas insulino dependientes se obtuvieron por administración de estreptozotocina disuelta en buffer citrato (50 mg/kg) por vía intraperitoneal en período previo al apareo. Cuatro días después de la administración de la droga, la diabetes se confirmó mediante la evaluación de las glucemias por obtención de sangre de la vena central de la cola. Dicho valor se cuantificó por método colorimétrico comercial empleando tiras reactivas y sensor de glucemia. Los niveles de glucosa en sangre de las ratas inyectadas con buffer citrato fueron inferiores a 100 mg/dL. Se incorporaron al grupo de ratas diabéticas aquellos animales con valores de glucemia mayores a 250 mg/dl.

Apareos

Hembras controles y diabéticas de peso entre 200 y 300 gr. fueron apareadas durante la noche con machos controles. A la mañana siguiente se les tomó una muestra del fluido vaginal y se observó al microscopio. La presencia de espermatozoides en el extendido vaginal evidencia el estado de preñez, designándose a éste como día 0,5 de gestación.

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical previa anestesia en cámara de CO₂ en el día 10,5 o 11,5 de gestación.

Tratamientos *in vivo* con agonistas dietarios de PPARs

En el día 0,5 de preñez tanto las ratas controles como diabéticas fueron asignadas al azar a 3 grupos experimentales:

- a.** Ratas sanas y diabéticas alimentadas con el alimento balanceado (dieta estándar).
- b.** Ratas sanas y diabéticas alimentadas con alimento balanceado suplementado con 6% de aceite de oliva el cual posee un 75% de ácidos grasos monoinsaturados (dieta suplementada con aceite de oliva).
- c.** Ratas sanas y diabéticas alimentadas con alimento balanceado suplementado con 6% de aceite de cártamo, el cual posee un 75% de ácidos grasos poliinsaturados (dieta suplementada con aceite de cártamo).

La adición a la dieta estándar de un 6% de los aceites de oliva y cártamo, que poseen un 75% de ácido oleico y linoleico respectivamente, produce una modificación en la composición de nutrientes de la dieta que se detallan en la siguiente tabla según el análisis realizado por el Instituto Nacional de Alimentos (INAL) de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT) del Ministerio de Salud (Tabla 1).

	Dieta estándar	Dieta estándar suplementada con 6% de aceite de oliva	Dieta estándar suplementada con 6% de aceite de cártamo
	cada 100g de dieta		
Carbohidratos (g)	50	48	47
Proteínas (g)	25	23,8	23
Grasas (g)	5	11	11
Contenido energético (KJ)	1356	1422	1443
Contenido de los principales ácidos grasos (g):			
16:0 (palmítico)	0,58	1,55	0,97
18:0 (esteárico)	0,16	0,26	0,25
18:1 (oleico)	1,27	5,77	1,81
18:2 (linoleico)	1,99	2,41	6,49
18:3 (linolénico)	0,73	0,57	0,55

Tabla 1. Composición dietaria analizado por el INAL

Tratamientos *in vivo* con ácido fólico

Desde 2 semanas previas al apareo, ratas controles y diabéticas fueron inyectadas diariamente con 0,5 ml de una solución de ácido fólico (10 mg/ml) disuelto en agua estéril para inyectables con agregado de NaOH (1M) para neutralizar y disolver.

Para conformar el grupo control se inyectaron ratas controles y diabéticas diariamente con agua estéril para inyectables.

Obteniéndose 3 grupos experimentales:

- a.** Ratas controles y diabéticas inyectadas con agua estéril y alimentadas con alimento balanceado (dieta estándar)
- b.** Ratas controles y diabéticas inyectadas con ácido fólico y alimentadas con alimento balanceado (dieta estándar + folato)
- c.** Ratas controles y diabéticas inyectadas con ácido fólico y alimentadas desde el día 0,5 de preñez con alimento suplementado con aceite de cártamo (dieta suplementada con aceite de cártamo + folato).

Obtención de embriones y deciduas

En el día 10,5 de preñez, las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical. Se extrajo el útero y se lo colocó en cajas de Petri con Medio Krebs-Ringer Bicarbonato salino con capacidad buffer (KRB): 5 mM glucosa, 145 mM Na⁺, 2,2 mM Ca⁺⁺, 1,2 mM Mg⁺⁺, 127 mM Cl⁻, 25 mM HCO₃⁻, 1,2 mM SO₄²⁻ y 1,2 mM PO₄³⁻.

Utilizando pinzas y tijeras se abrió el útero bajo lupa y se removió la decidua con el embrión en su interior, algunas de las mismas fueron utilizadas para análisis inmunohistoquímico o embebidas en medio de montaje para cortes de crióstato. En otros casos, se separó de la decidua al embrión rodeado por las membranas de Reichert, el saco vitelino y el amnios. Los embriones fueron separados de dichas membranas y evaluados morfológicamente. Luego, tanto las deciduas como los embriones fueron congelados a -80°C para posterior realización de las determinaciones que se describen a continuación. Se cuantificaron las deciduas que presentaban reabsorciones embrionarias y las mismas no fueron utilizadas para las determinaciones.

Morfología embrionaria

La morfología embrionaria fue analizada bajo lupa, determinándose la viabilidad mediante la observación de latido cardíaco, el grado de cierre de tubo neural, el desarrollo cardíaco, el número de somitas y el grado de rotación sobre el eje axial embrionario.

Se consideraron embriones malformados aquellos que presentaban: Tubo neural abierto, cierre asimétrico de tubo neural, anomalías cardíacas, anomalías de rotación del eje axial.

Determinación de proteínas

La determinación de proteínas de las muestras fue realizada según la técnica descrita por Bradford (Bradford 1976). Una alícuota de 10 μl de tejido decidual homogeneizado o embrionario sonicado fue diluida en 800 μl de solución salina y posteriormente se le adicionó 200 μl 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 fue obtenida mediante la comparación con una curva de calibración realizada utilizando BSA en diferentes concentraciones como estándar.

Niveles de PGI₂

La determinación de los niveles de PGI₂ se realizó mediante la cuantificación de 6-ceto-PGF_{1 α} , metabolito estable de PGI₂ e índice de su producción (FitzGerald y col. 1983), mediante un equipo comercial. El método se basa en la competencia entre un trazador colorimétrico (acetilcolinesterasa unido a 6-ceto-PGF_{1 α}) y la 6-ceto-PGF_{1 α} contenida en la muestra por el anticuerpo anti-6-ceto-PGF_{1 α} .

Muestras de 4 embriones fueron sonicadas en 600 μl de buffer EIA (provisto por el kit) mientras que las muestras de deciduas se homogenizaron en 300 μl de buffer EIA y se utilizaron con una dilución 1:500. Una vez reservada una alícuota para la cuantificación de proteínas, el homogenato fue centrifugado y el sobrenadante se colocó en los wells de una microplaca; posteriormente se adicionó el trazador colorimétrico. Finalmente, se agregó el antisuero anti 6-ceto-PGF_{1 α} que se une a un anticuerpo fijo en la base de la microplaca. Se incubó la placa y se leyó la densidad óptica del complejo cromogénico a 405 nm, refiriendo las lecturas de las muestras a las absorbancias de una curva de concentraciones conocidas. Los resultados se expresaron como pg de 6-ceto-PGF_{1 α} por μg de proteína.

Niveles de PGE₂

Para la determinación de la concentración de PGE₂ en tejidos embrionarios y deciduales se realizó un radioinmunoensayo (RIA). 4 embriones fueron sonicados en 200 μl de medio fosfato salino (PBS: K₂HPO₄ 1,5 g/l, KH₂PO₄ 0,2g/l, NaCl 7,75 g/l) durante 5 segundos o 1 decidua fue homogenizada en 500 μl de PBS. En ambos casos, una alícuota del homogenato se utilizó para cuantificar la concentración de proteínas totales

por el método de Bradford. Las PGs fueron extraídas dos veces con 500 μ l de etanol absoluto y finalmente, el extracto fue evaporado en estufa de vacío y conservado a -20°C hasta la realización del RIA. Las muestras embrionarias y deciduales fueron reconstituidas en 250 μ l de buffer RIA: 1,411 g/l K_2HPO_4 , 0,228 g/l KH_2PO_4 , 9 g/l NaCl, 1 g/l NaN_3 , 1 g/l BSA, las muestras deciduales fueron diluidas 1:16.

El análisis se basó en el desplazamiento de la unión de la PGE_2 presente en la muestra con $^3\text{H-PGE}_2$ exógena. El anticuerpo utilizado fue desarrollado en conejo y se utilizó una dilución 1:10. Los residuos extraídos y los reactivos se reconstituyeron en PBS 0,01 M (pH 7,4) adicionado con 0,15% de NaCl, 0,1% BSA y 0,1% de azida sódica. Los resultados se expresaron en pg/ μ g de proteína. Para la separación entre la PGE_2 radiactiva acomplejada con el anticuerpo y la forma libre, se utilizó carbón (1%)-dextrano (0,1%).

Niveles de TXA_2

La determinación de los niveles de TXA_2 se realizó mediante la cuantificación de TXB_2 , metabolito estable de TXA_2 e índice de su producción, mediante un equipo comercial. El método se basa en la competencia entre un trazador colorimétrico (acetilcolinesterasa unido a TXB_2) y el TXB_2 presente en la muestra por el anticuerpo anti- TXB_2 . Al mantenerse la concentración del trazador constante, la variación en la concentración del TXB_2 será inversamente proporcional a la cantidad de trazador que permanezca unido al antisuero.

Se sonicaron muestras de 3 embriones en 500 μ l de buffer EIA o 1 decidua en 300 μ l de buffer EIA, una vez reservada una alícuota para la cuantificación de proteínas, el homogenato fue centrifugado y el sobrenadante se colocó en los wells de una microplaca y posteriormente se adicionó el trazador colorimétrico. Finalmente, se agregó el antisuero anti- TXB_2 que se une a un anticuerpo fijo en la base de la microplaca. Se incubó la placa y se leyó la densidad óptica del complejo cromogénico a 405 nm, refiriendo las lecturas de las muestras a las absorbancias de una curva de concentraciones conocidas. Los resultados se expresaron como pg de TXB_2 por μ g de proteína.

Niveles de peroxidación lipídica (TBARS)

Los lipoperóxidos fueron evaluados como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Janero 1990) por cuantificación del malondialdehído (MDA), producto de dicha reacción. Dos deciduas fueron homogeneizadas en 600 µl de buffer Tris-HCl 100 mM, pH 7,6. Se adicionó ácido tricloroacético (40% v/v) a los homogenatos y luego se los centrifugó a 3000 rpm por 10 min. A continuación se agregó al sobrenadante un volumen equivalente de ácido tiobarbitúrico (46 mM), y la solución fue calentada a 95 °C por 15 min. Luego se detuvo la reacción enfriando las muestras y el color desarrollado por cada una de ellas fue medido en espectrofotómetro a 530 nm. Diferentes concentraciones de MDA fueron procesadas en las mismas condiciones que los homogenatos tisulares para realizar una curva estándar. Los resultados fueron expresados como nmol de TBARS por mg de proteínas.

Niveles de isoprostanos

Se cuantificaron los niveles de 8-epi PGF_{2α} (8-isoprostano), mediante un equipo comercial. El método se basa en la competencia entre un trazador colorimétrico (acetilcolinesterasa unido a 8-isoprostano) y el 8-isoprostano presente en la muestra por el anticuerpo anti-8-isoprostano. Al mantenerse la concentración del trazador constante, la variación en la concentración del 8-isoprostano será inversamente proporcional a la cantidad de trazador que permanezca unido al antisuero.

Se sonicaron muestras de 3 embriones en 250 µl de NaOH 2N, una vez reservada una alícuota para la cuantificación de proteínas, se realizó la hidrólisis incubando el homogenato durante 2 horas a 45°C, se neutralizó agregando 250 µl de HCL obteniendo un pH=6-8, se centrifugó y el sobrenadante se colocó en los wells de una microplaca; posteriormente se adicionó el trazador colorimétrico. Finalmente, se agregó el antisuero anti-8-isoprostano que se une a un anticuerpo fijo en la base de la microplaca. Se incubó la placa y se leyó la densidad óptica del complejo cromogénico a 405 nm, refiriendo las lecturas de las muestras a las absorbancias de una curva de concentraciones conocidas. Los resultados se expresaron como pg de 8-isoprostano por µg de proteína embrionaria.

Cuantificación de nitratos/nitritos

Para la determinación de los niveles de nitratos/nitritos, índice de la producción de óxido nítrico, se utilizaron muestras de 4 embriones, que fueron sonicados en 250 μ l de solución Tris-HCl 100 mM. Una alícuota fue separada para la determinación de proteínas totales por el método de Bradford y el resto del homogenato fue utilizado para la determinación de la concentración de nitratos/nitritos mediante un equipo comercial. La determinación incluye una reducción enzimática de los nitratos presentes en la muestra por acción de la enzima nitrato reductasa y posteriormente se cuantificaron los nitritos como azo-compuestos coloreados mediante el reactivo de Griess (Green y col. 1982). Finalmente se determinó la densidad óptica del producto coloreado a 540 nm en un lector de placas, utilizando curvas de NaNO_3 y NaNO_2 como estándares. Los resultados se expresaron en nmoles por mg de proteínas.

Detección de la actividad de las MMPs

La técnica de zimografía que emplea gelatina como sustrato evalúa la actividad de las MMPs con actividad gelatinasa, como la MMP2 y MMP9 (Woessner 1995). Muestras de 5 embriones o 1 decidua fueron sonicadas u homogenizadas en 50 mM Tris, 5 mM CaCl_2 , 1 μ M ZnCl_2 , 1% Tritón X-100. Alícuotas de 20 μ g de proteínas del sonificado embrionario y de 50 μ g de proteínas del homogenato decidual previamente mezcladas con buffer muestra (2% SDS, 10% glicerol, 0,1% azul de bromofenol, 50 mM Tris-HCl, pH 6,8) fueron sometidas a electroforesis en geles de 7,5% poliacrilamida con 0,1 % de SDS copolimerizados con 1 mg/ml de gelatina. Luego de la corrida electroforética, los geles fueron lavados en solución de lavado 1 (Tris-HCl 50 mM, 2,5% de tritón X-100, pH 7,5) por 60 minutos para eliminar el SDS y posteriormente lavados por 3 veces durante 10 minutos, con solución de lavado 2 (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4). A continuación, los geles fueron incubados en buffer de digestión (50 mM de buffer Tris, pH 7,4, conteniendo 150 mM NaCl and 10 mM CaCl_2) por 96 hs para las muestras embrionarias y 24 hs para las muestras de decidua a 37 °C. El revelado se realizó por tinción con solución de azul de Comassie R-250 (0,5 % de azul de Comassie R250, en 30% de metanol/10% de ácido acético glacial en agua bidestilada) y posterior desteñido con solución desteñidora (30% de metanol/10% de ácido acético glacial en agua bidestilada), revelando de

esta manera, regiones claras localizadas donde el sustrato ha sido degradado. Las MMP-2 y MMP-9 fueron identificadas por el correspondiente peso molecular de las bandas proteolíticas visualizadas, en comparación con estándares comerciales de peso molecular preteñidos. Las formas latentes de proMMP-2 y proMMP-9 pueden ser visualizadas en estos geles debido a la presencia de SDS que desestabiliza la unión de cisteína al átomo de zinc, la cual mantiene inactivo al zimógeno. Las actividades enzimáticas en el gel fueron cuantificadas usando un programa analizador de imágenes, tanto con respecto a la superficie como a la intensidad de las bandas, expresándose en unidades densitométricas arbitrarias (designándole el valor 1 a la intensidad de la banda control de MMP9). Estas bandas de degradación enzimática son específicas, ya que desaparecen en presencia de EDTA 0,01 M en el buffer de digestión (resultado no mostrado). Como control positivo se utilizó medio condicionado procedente de cultivo celular de la línea HT-1080 (fibrosarcoma humano), que secreta altas cantidades de MMP-2 y MMP-9 (Sato y col. 1994).

Detección de la actividad inhibitoria de las MMPs por TIMPs

La actividad inhibitoria de los TIMPs fue evaluada por medio de la técnica de zimografía reversa (Staskus y col. 1991). Alícuotas de 20 µg de proteínas del sonicado embrionario y de 50 µg de proteínas del homogenato decidual, fueron diluidas en buffer muestra (2% SDS, 10% glicerol, 0,1% azul de bromofenol, 50 mM Tris-HCl, pH 6,8) y sometidas a electroforesis en geles de 15% poliacrilamida con 0,1 % SDS copolimerizado con 1 mg/ml de gelatina y 25 % de medio condicionado de células HT-1080. Luego de la electroforesis los geles fueron lavados en solución de lavado 1 (Tris-HCl 50 mM, 2,5% de tritón X-100, pH 7,5) por 60 minutos para eliminar el SDS y posteriormente lavados por 3 veces durante 10 minutos, con solución de lavado 2 (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4). A continuación, los geles fueron incubados en buffer de digestión (50 mM de buffer Tris, pH 7,4, conteniendo 150 mM NaCl and 10 mM CaCl₂) por 24 hs a 37 °C. Luego de la incubación fueron teñidos con solución teñidora (0,5 % de azul de Comassie R-250, en 30% de metanol/10% de ácido acético glacial en agua bidestilada) y desteñidos con solución desteñidora (30% de metanol/10% de ácido acético glacial en agua bidestilada). La actividad inhibitoria de los TIMPs se evidenció como bandas oscuras en un fondo claro que

corresponde a la inhibición de la degradación de la gelatina, degradación presente en la matriz del gel por acción de las MMPs del medio condicionado donde no ejercieron su acción los TIMPs. Los TIMPs fueron identificados por comparación con los marcadores de peso molecular y controles positivos, y sus niveles evaluados por densitometría utilizando un programa analizador de imágenes (Image J).

Western Blot de PPARs y TIMPs

El tejido decidual fue homogeneizado y luego sonicado durante 10 segundos en 200 μ l de buffer de lisis (20mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2% cóctel inhibidor de proteasas, pH 7,4) e incubadas a 4 °C por 2 horas. Luego se procedió a centrifugar durante 10 minutos a 10000 rpm, 4 °C el homogenato de las distintas muestras, recuperándose el sobrenadante de las mismas para la evaluación de los niveles de las diferentes proteínas, en forma semejante a lo realizado previamente (Pustovrh y col. 2007). Una alícuota de esa fracción fue empleada para la determinación de proteínas como se detalló anteriormente. De cada muestra se tomó un volumen equivalente a 100 μ g de proteínas y se lo diluyó en buffer muestra 4X (2% SDS, 10% glicerol, 0,1% azul de bromofenol, 50 mM Tris-HCl, pH 6,8). Las muestras fueron sometidas a 100 °C durante 5 minutos con el objeto de desnaturalizar las proteínas.

Las mismas fueron sembradas en un gel SDS-PAGE 15% en condiciones desnaturalizantes y se procedió a realizar la corrida electroforética. Finalizada la electroforesis los geles fueron lavados durante 30 minutos en buffer de transferencia (Trizma base 20 mM, glicina 150 mM, metanol 20%, pH 8,8), con el objeto de eliminar el SDS remanente.

Las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa, utilizando para ello un sistema de transferencia húmedo, en el cual todo el sistema (filtros, membranas y geles) se encuentra sumergido en el buffer de transferencia durante todo el proceso de la electrotransferencia, la cual se realizó durante 1 hora a 100 V a 4 °C. Finalizada la transferencia, se confirmó la misma mediante la tinción con rojo Ponceau. Luego las membranas fueron incubadas durante toda la noche con solución de bloqueo (1% de BSA en TBS: Trizma base 25 mM, 136,7 mM NaCl, 2,68 mM KCl, pH 7,4). Posteriormente las membranas se lavaron e incubaron con el anticuerpo primario diluido en TBS con 2 %

BSA durante toda la noche a 4 °C. Los anticuerpos utilizados fueron anti-PPAR α (diluido 1:200), anti-PPAR δ (diluido 1:200), anti-PPAR γ (diluido 1:200), anti-TIMP1 (diluido 1:200), anti-TIMP2 (diluido 1:200) o anti-TIMP3 (diluido 1:200) Luego de la incubación se realizaron 4 lavados de 10 minutos cada uno con TTBS (TBS + 0,05% Tween-20) y 3 lavados de 10 minutos cada uno con TBS para eliminar el anticuerpo no unido de manera específica. Finalizados los lavados se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación con el anticuerpo secundario anti-IgG del animal correspondiente conjugado con la enzima peroxidasa (dilución: 1/10000). Se realizaron nuevamente los lavados de la membrana y se procedió al revelado de la misma por medio de la técnica de quimioluminiscencia. Para ello la membrana fue incubada en una solución reveladora durante 1 minuto. Luego, la membrana fue observada y fotografiada en el procesador de imágenes ImageQuant (GE Healthcare) especialmente diseñado para detección de quimioluminiscencia.

La identidad de las proteínas se estableció mediante la utilización de estándares de peso molecular, controles positivos y, en todos los casos, las bandas seleccionadas se encontraban ausentes en el control negativo, realizado mediante la omisión del anticuerpo primario.

Luego la membrana de nitrocelulosa fue sometida a remoción del anticuerpo primario, incubándola durante 1 h 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 anticuerpo anti-actina, para realizar el control de carga. El anticuerpo anti-actina se utilizó en una dilución 1:500 y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo secundario y el revelado se realizó de la misma forma que la descrita anteriormente para los otros anticuerpos.

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, al que se le asignó valor 1, luego de normalizarlo según el valor densitométrico correspondiente a la actina.

Inmunolocalización de MMPs, TIMPs y residuos de nitrotirosina

Deciduas de ratas sanas y diabéticas con el embrión en su interior fueron explantados en día 10,5 de gestación tal como se detalló anteriormente, se fijaron en solución de HOPE I a 0-4°C durante 48 horas, luego se comenzó el proceso de deshidratación para la inclusión en parafina. Se descartó la solución HOPE I y se adicionó 5 ml de una solución 1:1000, HOPE II:acetona preparada en frío, se incubó a 0-2°C por 1 hora. Pasado este tiempo se cambió la solución HOPE II-acetona por 5 ml de acetona pura enfriada previamente y se incubó 1 hora a 0-2°C (este último paso se repitió 3 veces).

Luego de los pasos de deshidratación, se descartó la acetona, se adicionó parafina a 56°C y se incubó por 12 horas en estufa a temperatura constante a 56°C.

Finalizado este período, se dispuso el tejido en cubos de parafina líquida localizando la orientación mesometrial-antimesometrial de la decidua y, finalmente, se los dejó solidificar a temperatura ambiente.

Cortes seriados transversales de 5 micrones de grosor fueron realizados con un micrótopo. Los cortes fueron colocados en portaobjetos cargados.

Para la inmunolocalización con anticuerpos, los cortes fueron desparafinados en xilol 2 veces durante 10 minutos, y luego fueron rehidratados sometiendo a: etanol 100 %, etanol 90%, etanol 80%, etanol 70% y PBS durante 10 minutos en cada solvente. Luego, se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución 0,3 % de peróxido de hidrógeno durante 20 minutos, ya que el sistema de revelado se fundamenta en interacciones con peroxidases exógenas, finalizado el bloqueo se realizan lavados con PBS y PBS-tween (0,05%).

Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en PBS-tween (0,05%) adicionados con 1% BSA en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 12 horas. Los anticuerpos utilizados fueron anti-nitrotirosina (diluido 1:1500), anti-MMP2 (diluido 1:200), anti-MMP9 (diluido 1:800), anti-TIMP1 (diluido 1:500), anti-TIMP2 (diluido 1:700) o anti-TIMP3 (diluido 1:500). Luego de ese período se lavó 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 (ABC) diluido 1:100 en PBS, y se incubó durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente.

A continuación se lavó y se reveló la presencia del primer anticuerpo mediante el agregado del sustrato de la peroxidasa, DAB 0,04% en Tris 0,06 M pH 7,4 y peróxido de hidrógeno 0,01% durante 10 minutos. La enzima peroxidasa cataliza la oxidación de DAB obteniendo color marrón en el lugar de la inmunomarcación. La reacción para el revelado fue detenida luego de 10 minutos con agua. Finalmente, se lavó el exceso de sustrato y producto cromogénico con PBS.

El control negativo consistió en procesar los cortes de igual forma, pero omitiendo el anticuerpo primario.

Posteriormente se deshidrataron los cortes sometiéndolos a: etanol 70 %, etanol 80%, etanol 90% etanol 100% durante 10 minutos cada uno y 3 veces xilol 100% durante 10 minutos. Finalmente, se colocó fijador Entellan sobre el corte y se tapó con un cubreobjetos.

La intensidad y área de la inmunomarcación en los embriones y las deciduas procesadas para inmunolocalización de residuos de nitrotirosina, MMPs y TIMPs fueron observadas en un microscopio Zeiss Axiostar y analizadas con el programa ImageProPlus. Para cada condición experimental, la intensidad y el área de la marcación fue evaluada en 5 muestras correspondientes a distintos animales. Los datos que se muestran son relativos al valor 1 asignado al valor medio de la intensidad en el tejido control.

Estudio de la tasa MMPs/TIMPs mediante zimografía *in situ*

Se realizó una zimografía *in situ* en secciones de tejido decidual congeladas para visualizar la actividad gelatinolítica sobre cortes histológicos (Mook y col. 2003). Para ello, las deciduas se embebieron en líquido de montaje que se solidificó con hielo seco teniendo en cuenta la orientación mesometrial-antimesometrial de las mismas. El tejido fue cortado en secciones seriadas de 16 µm de espesor mediante un crióstato a -20°C.

Los cortes de tejido fueron incubados en cámara húmeda en oscuridad con 20 µg/ml de gelatina DQ con fluorescencia capturada proveniente de piel de cerdo en una solución Tris-CaCl₂ (0,5 M Tris, 50 mM CaCl₂, 1,5 M NaCl, 2 mM azida sódica) por 90 minutos colocando un cubreobjetos sobre el corte. Finalizada la incubación, se removió el cubreobjeto y se realizaron varios lavados con PBS para finalmente montar el corte con una solución 1:1 de PBS:glicerol y un cubreobjetos.

Las secciones fueron examinadas bajo microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiophot) equipado con una cámara de captura directa de imagen.

La actividad proteolítica de las MMPs es detectada como fluorescencia verde brillante dado que la gelatina DQ se encuentra conjugada con fluoresceína de forma tal que la fluorescencia se encuentra capturada, liberándose la misma ante la degradación del sustrato por las MMPs.

La actividad gelatinolítica se determinó evaluando la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia utilizando el programa ImageProPlus. Para cada condición experimental, la intensidad y el área de la marcación fue evaluada en 5 muestras correspondientes a distintos animales. Los datos que se muestran son relativos al valor 1 asignado al valor medio de la actividad gelatinolítica del tejido control.

Para confirmar la actividad específica de las MMPs en los cortes, se incubaron las secciones con gelatina DQ en presencia de 0,1 mM de o-phenantrolina y 0,1 mM phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF), observándose que la actividad gelatinasa se inhibe completamente con o-phenanthrolina, mientras que no se observan efectos con la incubación con PMSF (datos no mostrados).

Determinaciones estadísticas

Los datos de número de reabsorciones expresan el número de reabsorciones/total de sitios de implantación y los datos de número de malformaciones expresan el número de embriones malformados/total de embriones viables y sus comparaciones fueron realizadas empleando el test de chi cuadrado.

El resto de los resultados de este estudio representan la media y el error estándar. Las comparaciones entre grupos fueron llevadas a cabo, según correspondiera, empleando test t-Student al analizar 2 grupos experimentales, ANOVA de un factor al estudiar más de dos grupos experimentales, y ANOVA de dos factores al realizar el análisis estadístico de los tratamientos dietarios y con administración de ácido fólico efectuados en animales controles y diabéticos, utilizándose el test de Tukey como complementario. Para el análisis estadístico realizado se utilizó el software Graphpad Prisma 4 y Graphpad InStat 3. Las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando p fue menor a 0,05.



Resultados

Capítulo I

Anomalías inducidas por la diabetes en el embrión y la decidua de rata en el período de organogénesis temprana

El presente estudio se inició con el análisis de características morfológicas y vinculadas al desarrollo embrionario en un modelo de diabetes y preñez inducido por estreptozotocina, droga que fue administrada en forma preconcepcional.

Se centró el estudio en el embrión y el tejido decidual en etapa de organogénesis temprana, período de elevada susceptibilidad para la inducción de malformaciones embrionarias (Eriksson y col. 2003).

La decidua, tejido materno producto de la modificación del endometrio uterino, rodea al embrión en el período de organogénesis temprana y provee de sustento, nutrientes y compuestos necesarios para el normal desarrollo embrionario. Es de fundamental importancia el estudio de la decidua ya que, alteraciones en el tejido decidual podrían condicionar el correcto desarrollo embrionario.

En primer lugar, caracterizando el modelo experimental, se evaluó la glucemia materna, parámetros del crecimiento embrionario como el contenido proteico del embrión y el número de somitas por embrión y el porcentaje de reabsorciones y malformaciones embrionarias de ratas sanas y con diabetes.

Glucemia materna, parámetros de crecimiento embrionario, tasa de reabsorción y malformación embrionaria

Se estudiaron animales sanos y diabéticos en el día 10,5 de gestación.

Cuando evaluamos la glucemia de las ratas, observamos que en las ratas diabéticas la misma se encontró incrementada respecto a la glucemia materna de las ratas sanas ($p < 0,001$) (Tabla I).

Al analizar el contenido proteico del embrión, un índice de crecimiento embrionario, se observó que este parámetro se encuentra disminuido en el embrión de rata diabética respecto al embrión de rata sana ($p < 0,001$) (Tabla I).

Además, al estudiar el número de somitas por embrión, índice que indentifica el grado de desarrollo embrionario, se observó que ese parámetro se encuentra disminuido en el embrión de rata diabética cuando se compara con el número de somitas por embrión de rata control ($p < 0,01$) (Tabla I).

	Control	Diabético	t de student
Glucemia materna (mg/dl)	101±9	411±28	p<0,001
Contenido proteico embrionario (µg)	56±4,2	28±3,0	p<0,001
Número de somitas por embrión	13±0,5	11±0,4	p<0,01

Tabla I. Glucemia materna y parámetros de crecimiento y desarrollo embrionario en el período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 14 ratas. Test estadístico: t de student.

En el modelo de diabetes evaluado se encuentra incrementado el porcentaje de reabsorciones embrionarias ($p < 0,001$) cuando se compara con dichos porcentajes en las ratas sanas (Tabla II), observándose en las ratas

diabéticas valores cinco veces mayores de este índice que en los animales sanos.

En cuanto al índice de malformaciones embrionarias, el mismo se encuentra incrementado más de siete veces en las ratas diabéticas en relación al control ($p < 0,001$) (Tabla II).

	Control	Diabético	Chi cuadrado
Número de reabsorciones (%)	10/155 (6,4%)	63/183 (34,5%)	$p < 0,001$
Número de malformaciones (%)	3/145 (2,0%)	18/120 (14,6%)	$p < 0,001$

Tabla II. Tasa de reabsorción y malformación embrionaria en el período de organogénesis temprana. Los datos de número de reabsorciones expresan el número de reabsorciones / total de sitios de implantación y los datos de número de malformaciones expresan el número de embriones malformados / total de embriones viables. Test estadístico: chi cuadrado.

Niveles de PPARs en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) son receptores nucleares que se encuentran involucrados en procesos antiinflamatorios, de diferenciación celular y en la homeostasis lipídica, entre otros procesos (Moraes y col. 2006) (Feige y col. 2006).

Dadas las alteraciones observadas en los parámetros de crecimiento y desarrollo embrionarios y en la tasa de reabsorciones y malformaciones embrionarias en las ratas diabéticas y sabiendo que PPAR δ tiene un rol fundamental en el desarrollo embrionario (Braissant y Wahli 1998; Wang y col. 2007), fue de interés evaluar los niveles de este receptor nuclear en el embrión y la decidua de rata durante la organogénesis temprana.

Si bien PPAR δ es la única isoforma presente en el embrión en etapa de organogénesis temprana (Braissant y Wahli 1998), se desconocía si los tres isotipos de PPARs se expresan en la decidua en esta etapa de desarrollo.

Los niveles de PPAR δ fueron evaluados en los embriones y las deciduas de ratas sanas y diabéticas en el día 10,5 de gestación mediante western blot.

Se observó que los niveles de PPAR δ se encuentran disminuidos en los embriones provenientes de ratas diabéticas ($p < 0,01$) cuando se comparan dichos valores con los del embrión de rata sana (Figura 1).

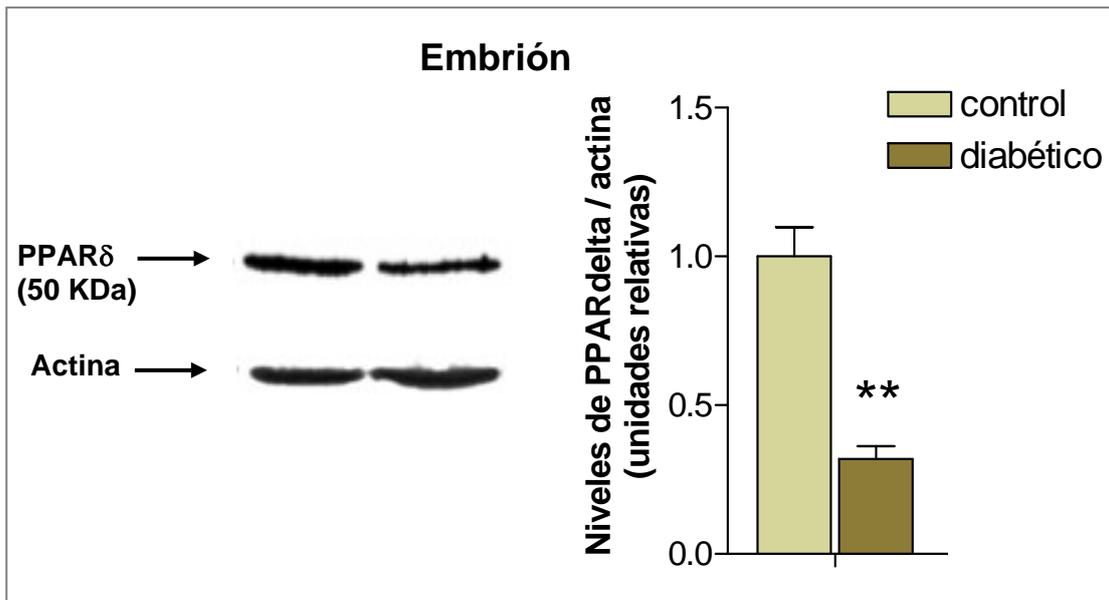


Figura 1. Western Blot representativo y cuantificación de los niveles de PPAR δ / niveles de actina en el embrión de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. ** $p < 0,01$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

Abocándonos al estudio del tejido decidual, se evaluaron los niveles de los receptores nucleares PPAR δ , PPAR γ y PPAR α en las deciduas de ratas sanas y diabéticas en el día 10,5 de gestación mediante western blot.

Los niveles de PPAR δ se encontraron disminuidos en las deciduas de ratas diabéticas ($p < 0,05$) respecto a la deciduas de ratas sanas (Figura 2 A).

No se observaron diferencias en los niveles de PPAR γ o PPAR α cuando se compararon las deciduas de ratas diabéticas con las de ratas sanas (Figura 2 B y C).

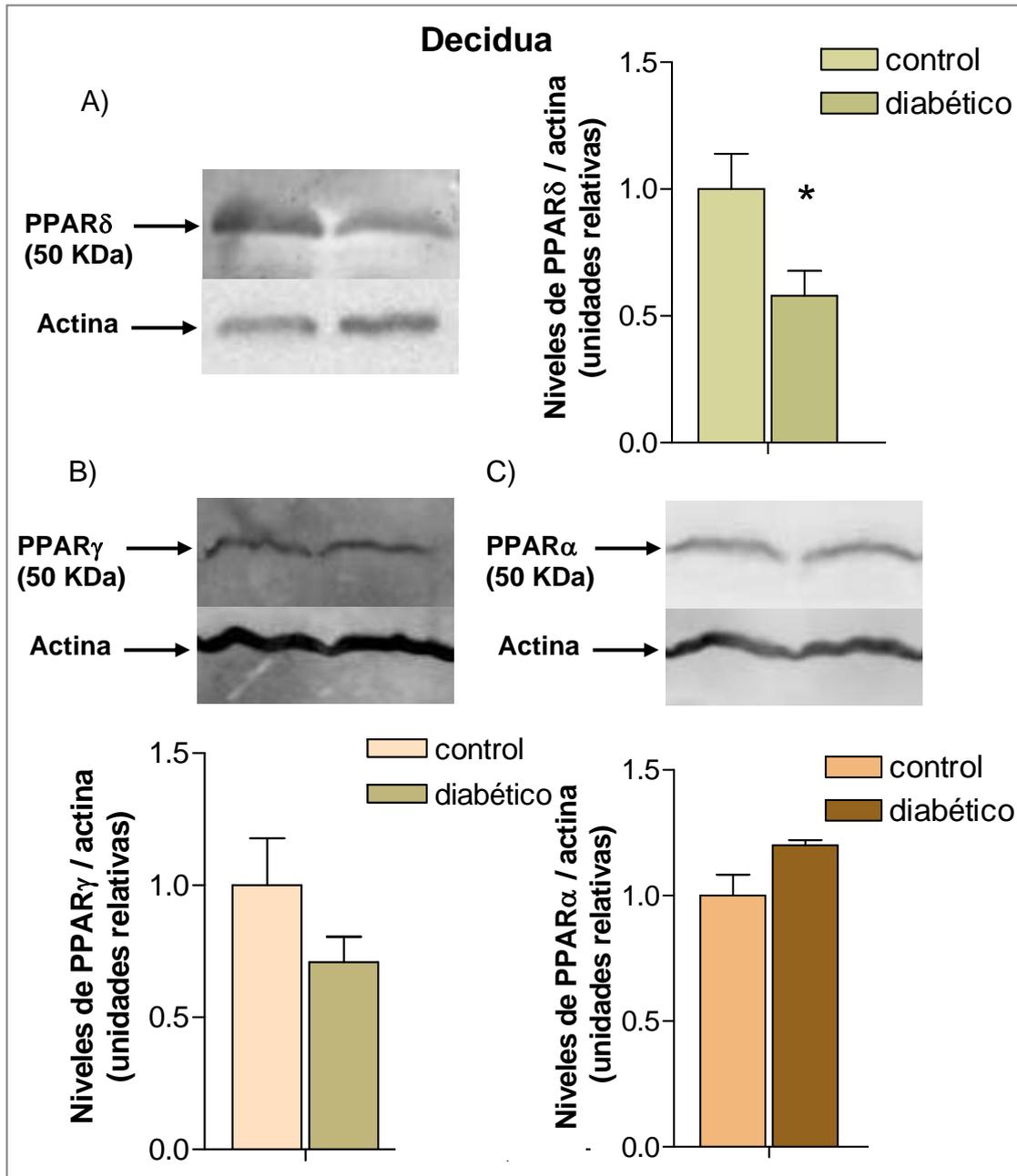


Figura 2. Western Blot representativo y cuantificación de los niveles de PPAR α , PPAR γ y PPAR δ en la decidua de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. * $p < 0,05$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

Niveles de PGI₂ en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

Considerando los elevados índices de reabsorciones y malformaciones embrionarias y hallazgos previos que muestran que la PGI₂ estaría

involucrada en los mecanismos de inducción de malformaciones embrionarias (Baker y col. 1990); sabiendo además que la PGI_2 es agonista endógeno de $PPAR\delta$ y conociendo que el ácido araquidónico, ácido graso esencial, es transferido a través de la decidua y el saco vitelino al embrión en esta etapa de desarrollo, se estudiaron los niveles de la PGI_2 en el embrión y la decidua en etapa de organogénesis temprana.

Los niveles de la PGI_2 se determinaron mediante el dosaje de los niveles de 6-ceto- $PGF_{1\alpha}$, metabolito estable de PGI_2 , en el día 10,5 de gestación en el tejido embrionario y decidual de ratas sanas y diabéticas utilizando un enzimoimmunoensayo.

Se observó que en el embrión de rata diabética los niveles de PGI_2 se encuentran disminuidos ($p < 0,05$) cuando se comparan dichos valores con los del embrión proveniente de rata sana (Figura 3 A).

En forma semejante, se observó que los niveles de PGI_2 también se encuentran disminuidos en el tejido decidual de rata diabética respecto al de rata control ($p < 0,05$) (Figura 3 B).

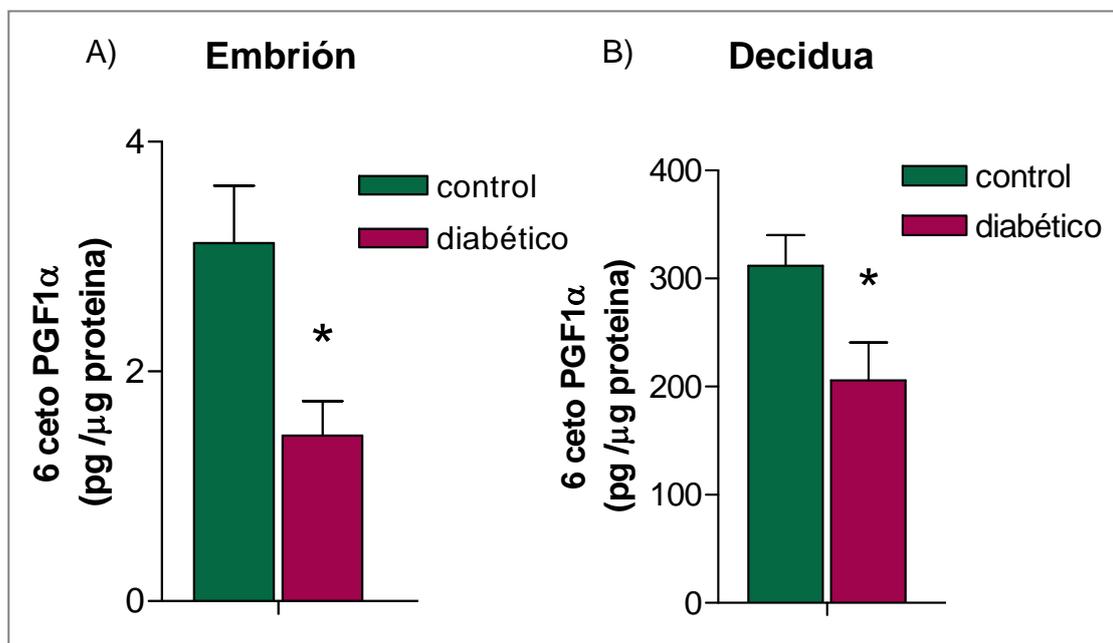


Figura 3. Niveles de PGI_2 en el embrión (A) y la decidua (B) de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. * $p < 0,05$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

Niveles de PGE₂ en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

Niveles adecuados de PGE₂ son necesarios para el correcto desarrollo embrionario ya que esta prostaglandina se encuentra vinculada al cierre del tubo neural en el embrión (Piddington y col. 1996) (Wentzel y col. 1999). Se dosaron los niveles de PGE₂ en los embriones y deciduas de ratas sanas y diabéticas en el día 10,5 de gestación mediante un radioinmunoensayo.

Se observó que en el embrión de rata diabética, los niveles de PGE₂ se encuentran disminuidos ($p < 0,05$) respecto a los niveles observados en el embrión de rata sana (Figura 4 A).

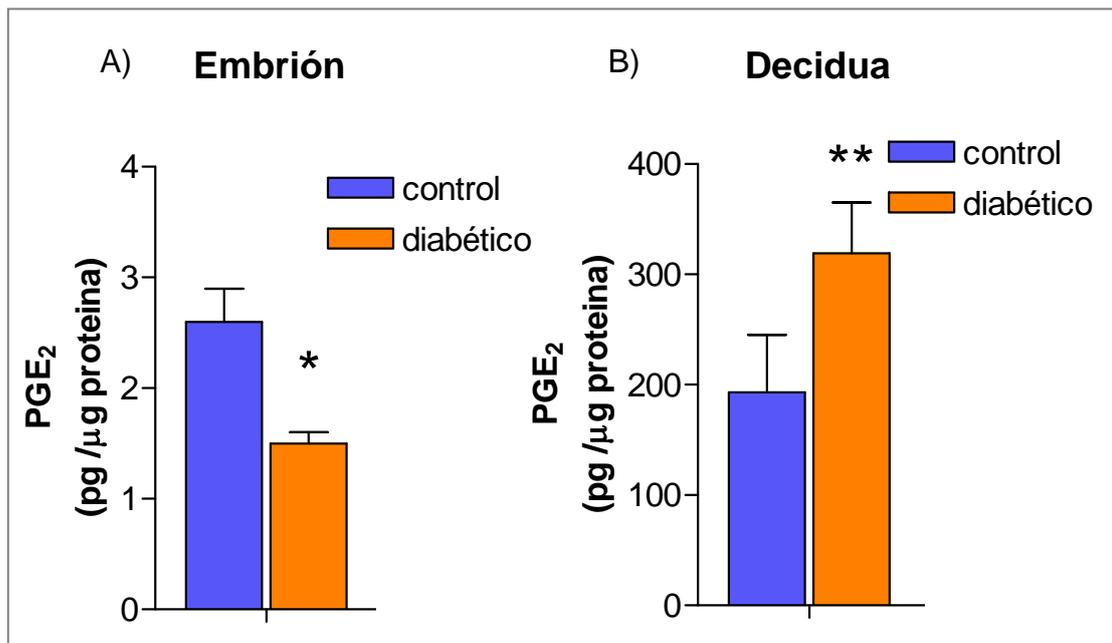


Figura 4. Niveles de PGE₂ en el embrión (A) y la decidua (B) de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

Por el contrario en la decidua donde el exceso de PGE₂ es un marcador del estado proinflamatorio tisular (Davies y col. 1984), observamos que los niveles de PGE₂ se encuentran incrementados en el tejido decidual de rata

diabética cuando se comparan con los valores de dicho prostanoide en la decidua de ratas controles ($p < 0,01$) (Figura 4 B).

Niveles de TXA_2 en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

Dadas las alteraciones en los niveles de PGI_2 y PGE_2 embrionarios y deciduales surge la duda de si estas alteraciones son específicas para estas PGs o es general de los prostanoideos debido a alteraciones en los niveles de ácido araquidónico o en la actividad de la COX. Es por ello que se estudió otro derivado del ácido araquidónico y producto de la COX, el TXA_2 , análisis realizado a través del dosaje de su metabolito estable TXB_2 , utilizando un enzimoimmunoensayo, en embriones y deciduas de ratas controles y diabéticas en el día 10,5 de gestación.

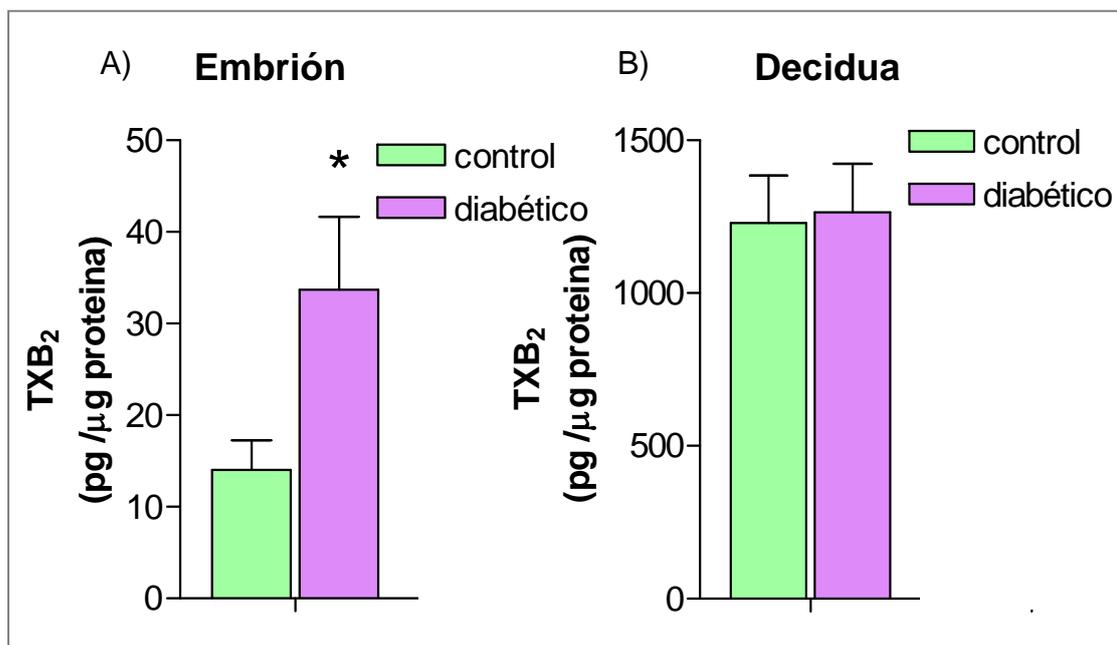


Figura 5. Niveles de TXA_2 en el embrión (A) y la decidua (B) de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. * $p < 0,05$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

Se observó que los niveles de TXA_2 se encuentran incrementados en los embriones provenientes de ratas diabéticas ($p < 0,05$) (Figura 5 A) respecto a los valores obtenidos para los embriones de ratas controles.

También a nivel decidual los cambios que se observaron son específicos para los diferentes prostanoïdes dado que no se observaron diferencias en los niveles de TXA_2 al comparar el tejido decidual de ratas sanas y diabéticas (Figura 5 B).

Producción de óxido nítrico en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

El óxido nítrico (NO) es una molécula que actúa como morfógeno durante el desarrollo embrionario (Lee y Juchau 1994), a altas concentraciones puede tener efectos deletéreos induciendo apoptosis (Plachta y col. 2003; Tranguch y col. 2003). Al combinarse con especies reactivas del oxígeno forma peroxinitritos, potentes agentes oxidantes que inducen daño a lípidos, proteínas y ADN (Beckman y Koppenol 1996).

Se dosaron los niveles de nitratos/nitritos, índice de la producción de NO, mediante el ensayo colorimétrico de Griess, en ratas sanas y diabéticas en el día 10,5 de gestación.

Los niveles de nitratos/nitritos se encuentran incrementados en el embrión de rata diabética cuando se comparan estos valores con los del embrión proveniente de rata sana ($p < 0,001$) (figura 6 A). La decidua de rata diabética también evidencia una elevada producción de NO respecto a los valores determinados en el tejido decidual de rata sana ($p < 0,01$) (Figura 6 B).

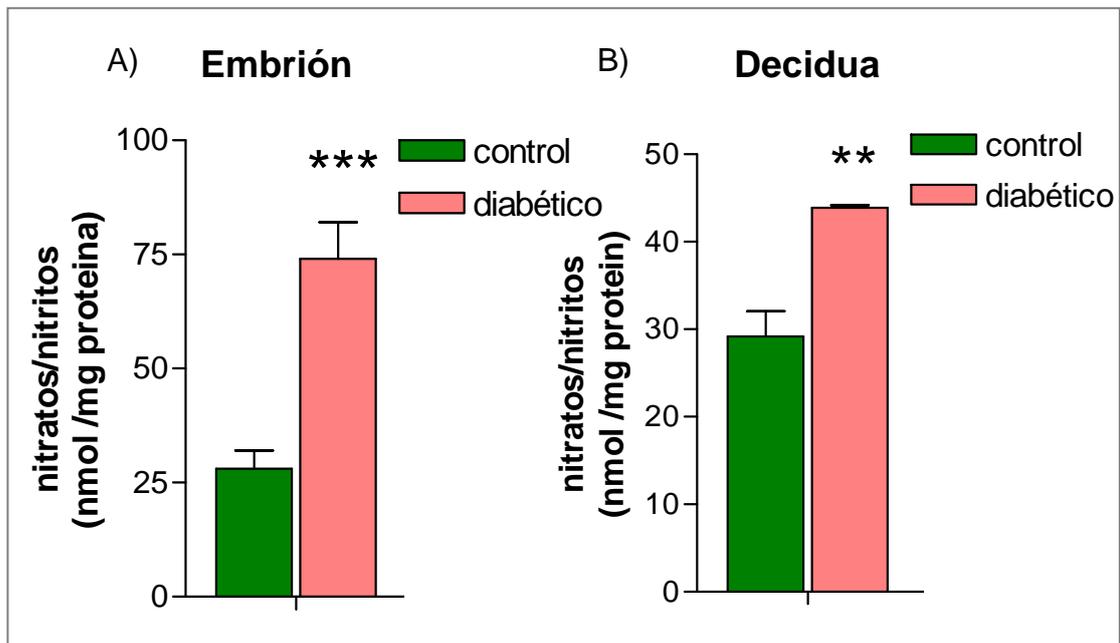


Figura 6. Niveles de NO en el embrión (A) y la decidua (B) de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

Niveles de peroxidación lipídica en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

La diabetes, a través de la hiperglucemia y el incremento de sustratos capaces de ser oxidados, genera un aumento de las especies reactivas de oxígeno que se evidencia en la mayoría de los tejidos (Nishikawa y col. 2000; Giacco y Brownlee 2010). Estas moléculas son altamente reactivas y tienen la capacidad de oxidar ácidos grasos poliinsaturados, provocando la peroxidación lipídica de los mismos y alterando de manera irreversible la estructura y función de las membranas biológicas (Girotti 1985).

La concentración de isoprostanos, producto de la lipoperoxidación del ácido araquidónico, es un sensible índice del estado oxidativo de los lípidos, que permite el análisis de la lipoperoxidación embrionaria. En este experimento se dosaron los niveles de isoprostanos mediante un

enzimoinmunoensayo en embriones de ratas controles y diabéticas en el día 10,5 de gestación.

Se observó que el embrión proveniente de rata diabética presenta un incremento en los niveles de isoprostanos respecto a los valores hallados en el embrión de rata sana ($p < 0,01$) (Figura 7 A).

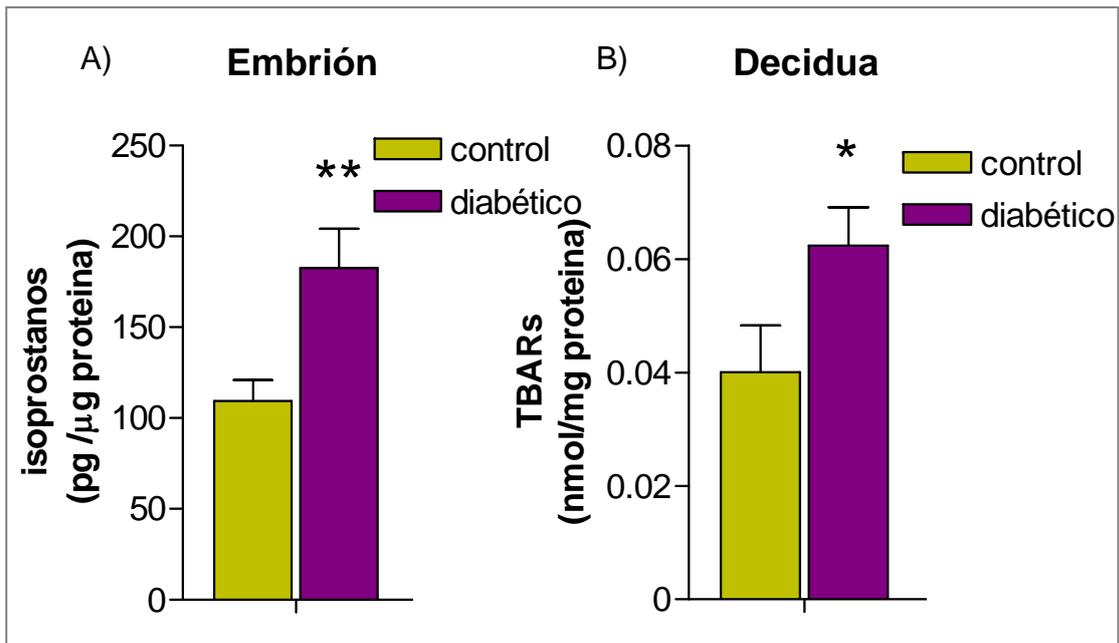


Figura 7. Niveles de isoprostanos en el embrión (A) y de TBARS en la decidua (B) de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

En el tejido decidual, los niveles de lipoperóxidos fueron determinados a través del dosaje de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) evaluándose este parámetro en las deciduas provenientes de ratas controles y diabéticas en el día 10,5 de gestación.

Se observó que la concentración de TBARS se encuentra incrementada en la decidua de rata diabética cuando se compara con los valores de TBARS en la decidua de ratas controles ($p < 0,05$) (Figura 7 B).

Inmunolocalización de residuos de nitrotirosina en el embrión y la decidua de rata control y diabética en periodo de organogénesis temprana

Dada la existencia en el embrión y la decidua de rata diabética de incrementos en los niveles de NO y de especies reactivas de oxígeno y sabiendo que cuando el NO se combina con el O_2^- se forman peroxinitritos que son potentes agentes oxidantes, que pueden nitrar los residuos de tirosina modificando en forma postraducciona múltiples proteínas (Webster y col. 2008), fue de interés evaluar la presencia de residuos de nitrotirosina.

Se realizó una inmunomarcación de residuos de nitrotirosina, índice del daño inducido por peroxinitritos en embriones y deciduas de ratas controles y diabéticas en el día 10,5 de gestación.

Los embriones de ratas diabéticas mostraron un incremento en la inmunomarcación para nitrotirosina en la región cefálica, cardíaca y caudal respecto a los embriones de ratas sanas ($p < 0,01$) (Figura 8 A).

Al evaluar la marcación para nitrotirosina en las deciduas, pudimos observar que el tejido decidual de ratas diabéticas evidenció un marcado incremento en la inmunomarcación para nitrotirosina que se localiza mayormente en la zona de lagunas sanguíneas de la decidua mesometrial en relación con la marcación de nitrotirosina observada en el tejido decidual de rata control ($p < 0,001$) (Figura 8 B).

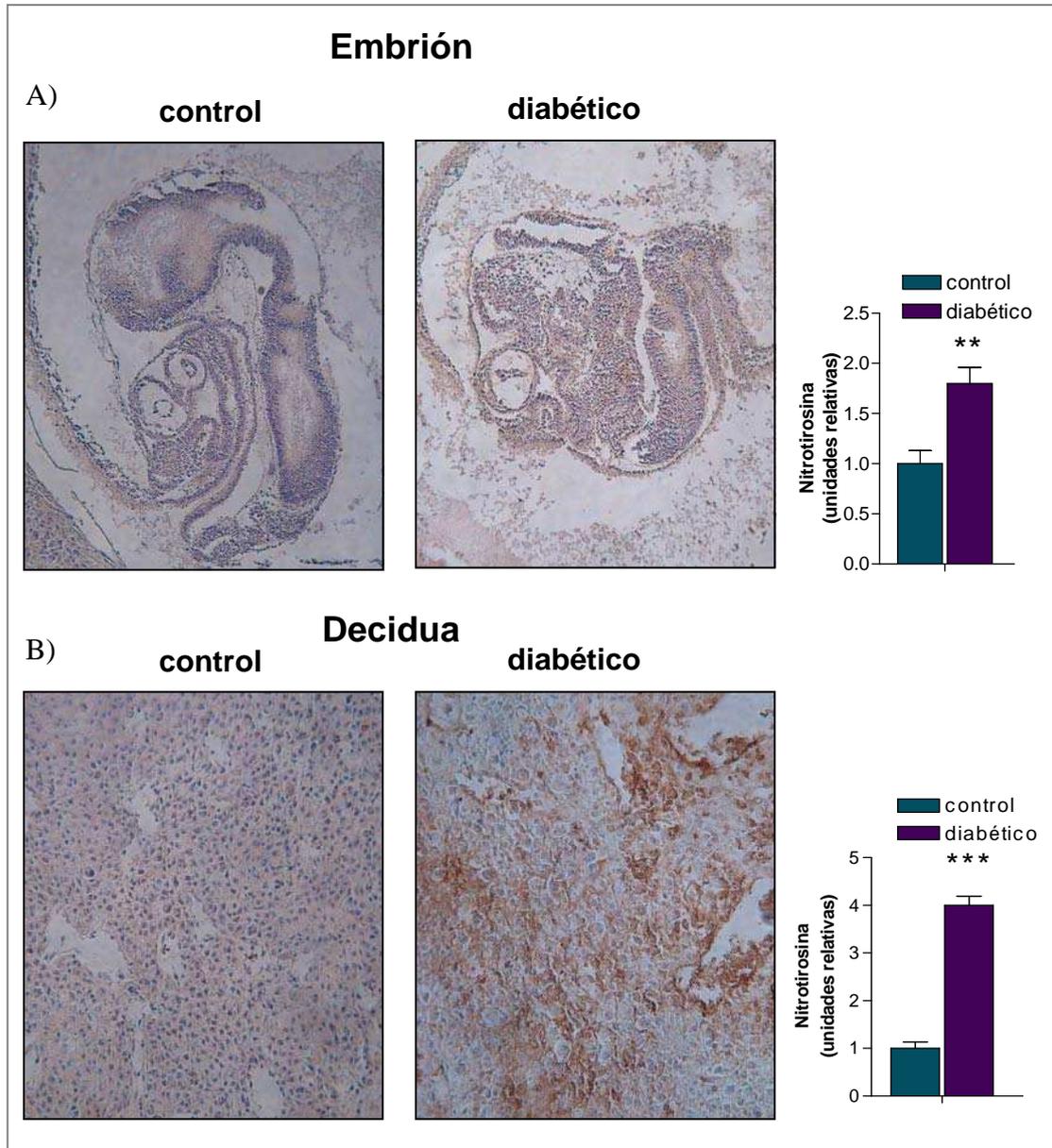


Figura 8. Inmunomarcación representativa y cuantificación de nitrotirosina en embriones (A y B) y deciduas (C y D) de ratas sanas y diabéticas en el día 10,5 de gestación. Magnificación original: 100X. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 5 ratas. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

Actividad de las metaloproteasas de la matriz extracelular en el embrión y la decidua de rata control y diabética en período de organogénesis temprana

Las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs) son endopeptidasas que regulan eventos fisiológicos y de desarrollo mediante la remodelación de la matriz extracelular, ya sea clivando directamente componentes de la matriz o a moléculas asociadas a la misma permitiendo de esta manera la liberación de componentes que se encontraban encriptados en la matriz extracelular.

Durante el desarrollo embrionario y feto-placentario, las MMPs están involucradas en la liberación de fragmentos de la matriz, factores de crecimiento y citoquinas que regulan el desarrollo del embrión y de la decidua que lo rodea (Vu y Werb 2000).

Se midió la actividad de MMPs por la técnica de zimografía en embriones y deciduas de ratas sanas y diabéticas en el día 10,5 de gestación. Esta técnica evalúa la actividad gelatinolítica de la MMP2 y MMP9 y por la composición del gel, permite evidenciar también la actividad gelatinolítica de las proMMPs.

En el zimograma representativo observamos las bandas correspondientes a la actividad gelatinolítica de MMP9, proMMP2 y MMP2 del control positivo que consiste en el medio condicionado de la línea celular HT1080, del embrión de rata sana y del embrión proveniente de rata diabética (Figura 9 A). En el embrión de rata diabética observamos un incremento en la actividad de la MMP9 ($p < 0,001$) (Figura 9 B), proMMP2 ($p < 0,001$) (Figura 9 C) y MMP2 ($p < 0,05$) (Figura 9 D) en relación a la actividad que estas gelatinasas presentan en el tejido control.

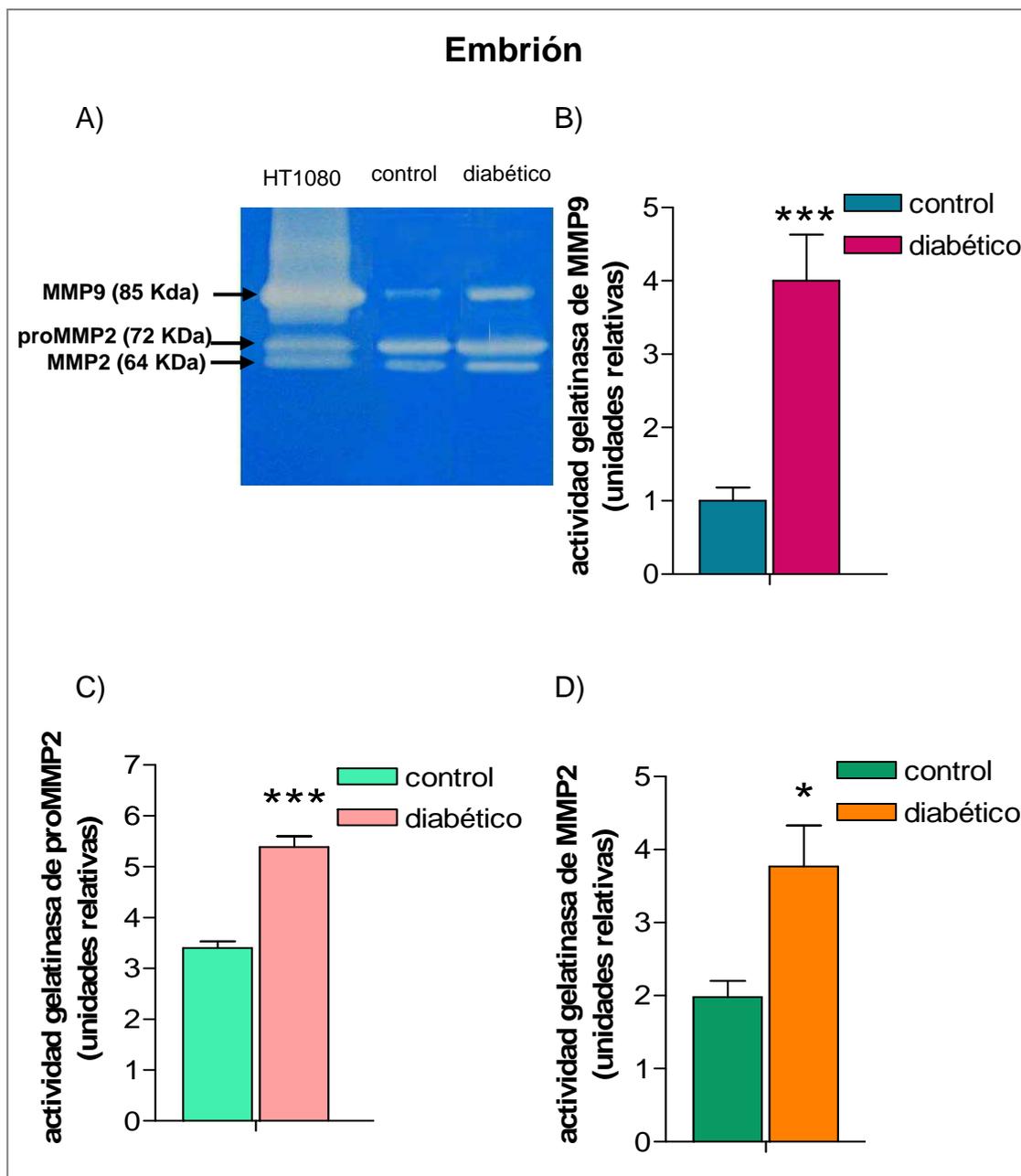


Figura 9. Zimografía representativa (A). Actividad de la MMP9 (B), proMMP2 (C) y MMP2 (D) en embriones de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. *** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

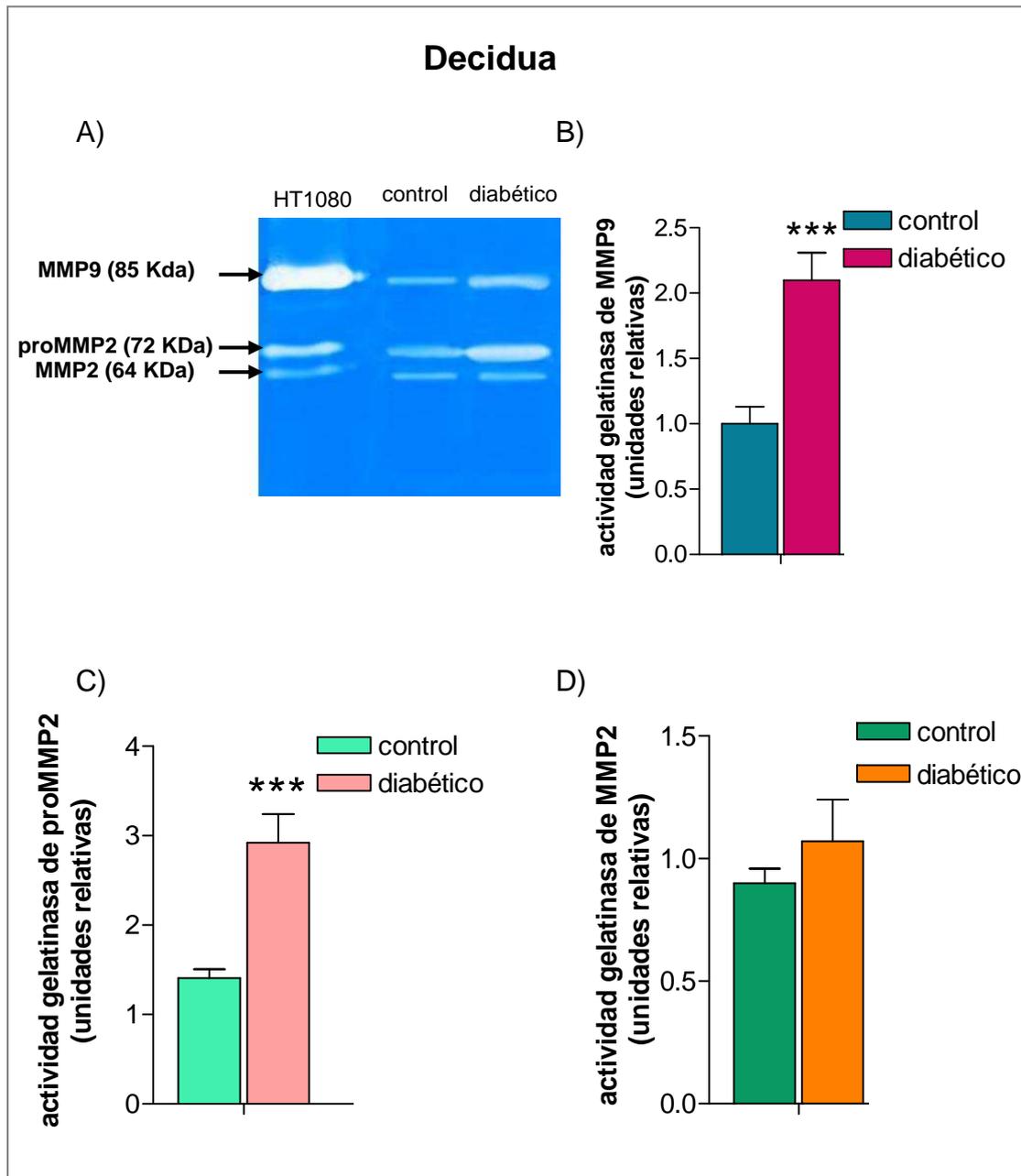


Figura 10, Zimografía representativa (A). Actividad de la MMP9 (B), proMMP2 (C) y MMP2 (D) en la decidua de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. *** $p < 0,001$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

En la Figura 10 A observamos en una zimografía representativa, las bandas correspondientes a la actividad gelatinolítica de la MMP9, proMMP2 y MMP2 del control positivo (medio condicionado de la línea celular HT1080), de la decidua de rata sana y de la decidua proveniente de rata diabética. En la decidua de rata diabética, se observó un incremento de la actividad de la MMP9 ($p < 0,001$) (Figura 10 B) y proMMP2 ($p < 0,001$) (Figura

10 C), mientras que no se observaron diferencias en la actividad de la MMP2 (Figura 10 D) cuando se compara con la actividad de estas MMPs en el tejido decidual de rata sana.

Detección de MMP9 en el embrión y la decidua de rata control y diabética en período de organogénesis temprana

Dado el incremento en la actividad de la MMP9 observado tanto en el tejido embrionario como decidual, fue de interés localizar mediante inmunomarcación la expresión proteica de la MMP9 en embriones y deciduas de ratas sanas y diabéticas en el día 10,5 de gestación.

Pudimos observar que la marcación para la MMP9 se encontró incrementada en forma bastante homogénea en los tejidos embrionarios provenientes de ratas diabéticas respecto a los embriones provenientes de ratas sanas ($p < 0,05$) (Figura 11 A).

Cuando evaluamos la marcación para la MMP9 en el tejido decidual, observamos un incremento en la inmunomarcación para esta proteína en el tejido decidual de las ratas diabéticas en comparación al control ($p < 0,05$) (Figura 11 B) evidenciándose dicho incremento en células deciduales y células gigantes del trofoblasto.

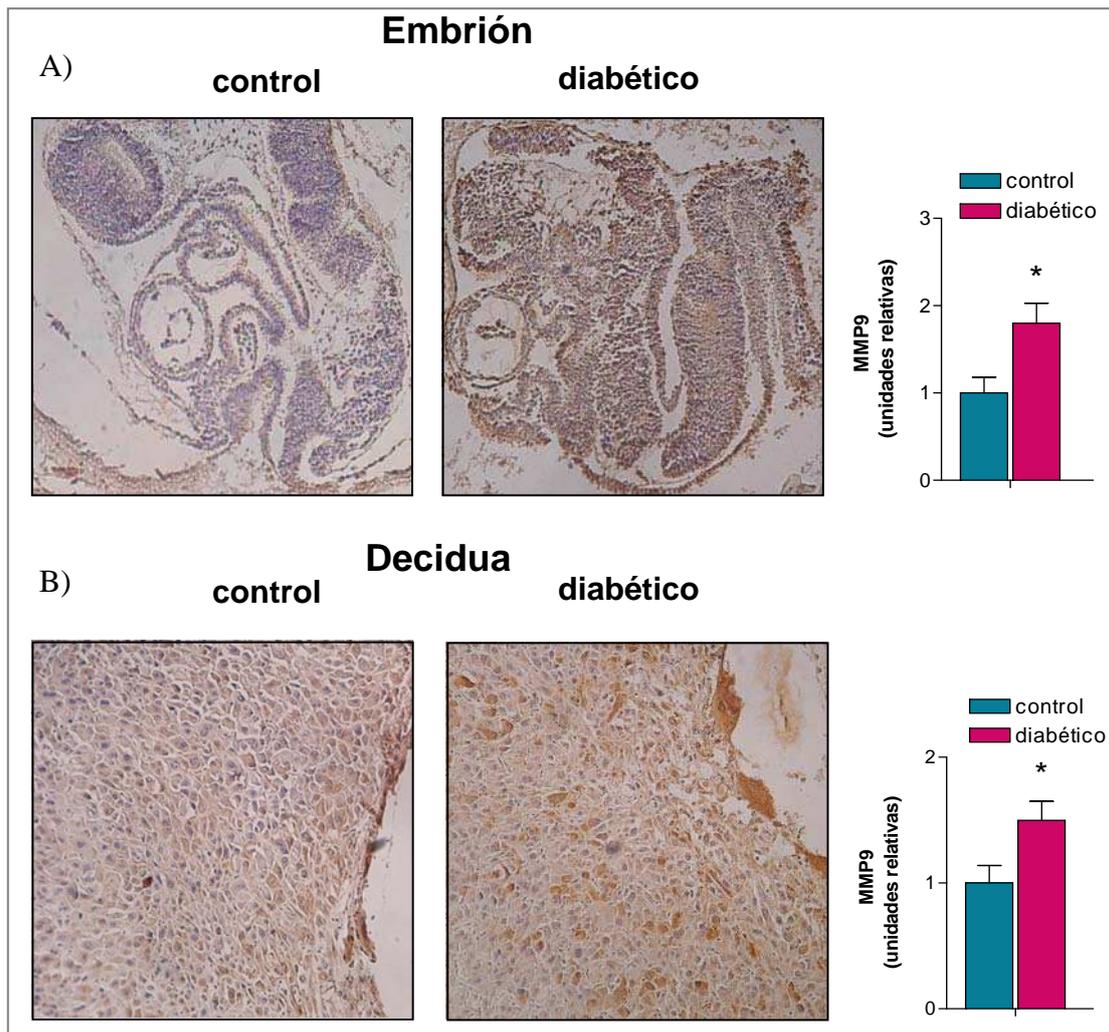


Figura 11. Inmunomarcación representativa y cuantificación de MMP9 en embriones (magnificación original: 100X) (A) y deciduas (magnificación original: 200X) (B) de ratas sanas y diabéticas en el día 10,5 de gestación. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 5 ratas. * $p < 0,05$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

Detección de MMP2 en el embrión y la decidua de rata control y diabética en período de organogénesis temprana

Debido a que la actividad de la MMP2 y su forma latente se encontraron incrementadas en los embriones de rata diabética y que la actividad de la proMMP2 se vio aumentada también en las deciduas de ratas diabéticas, fue de interés localizar la expresión proteica de la MMP2 mediante inmunohistoquímica en los embriones y las deciduas de ratas sanas y diabéticas en el día 10,5 de gestación.

Al evaluar la expresión de la MMP2, pudimos observar un incremento en la marcación de esta proteína que se distribuye de forma homogénea en los embriones de ratas diabéticas en relación a los embriones de ratas sanas ($p < 0,01$) (Figura 12 A).

En la decidua de rata diabética, la inmunomarcación para la MMP2 se mostró incrementada respecto al control ($p < 0,01$) (Figura 12 B) en las células deciduales.

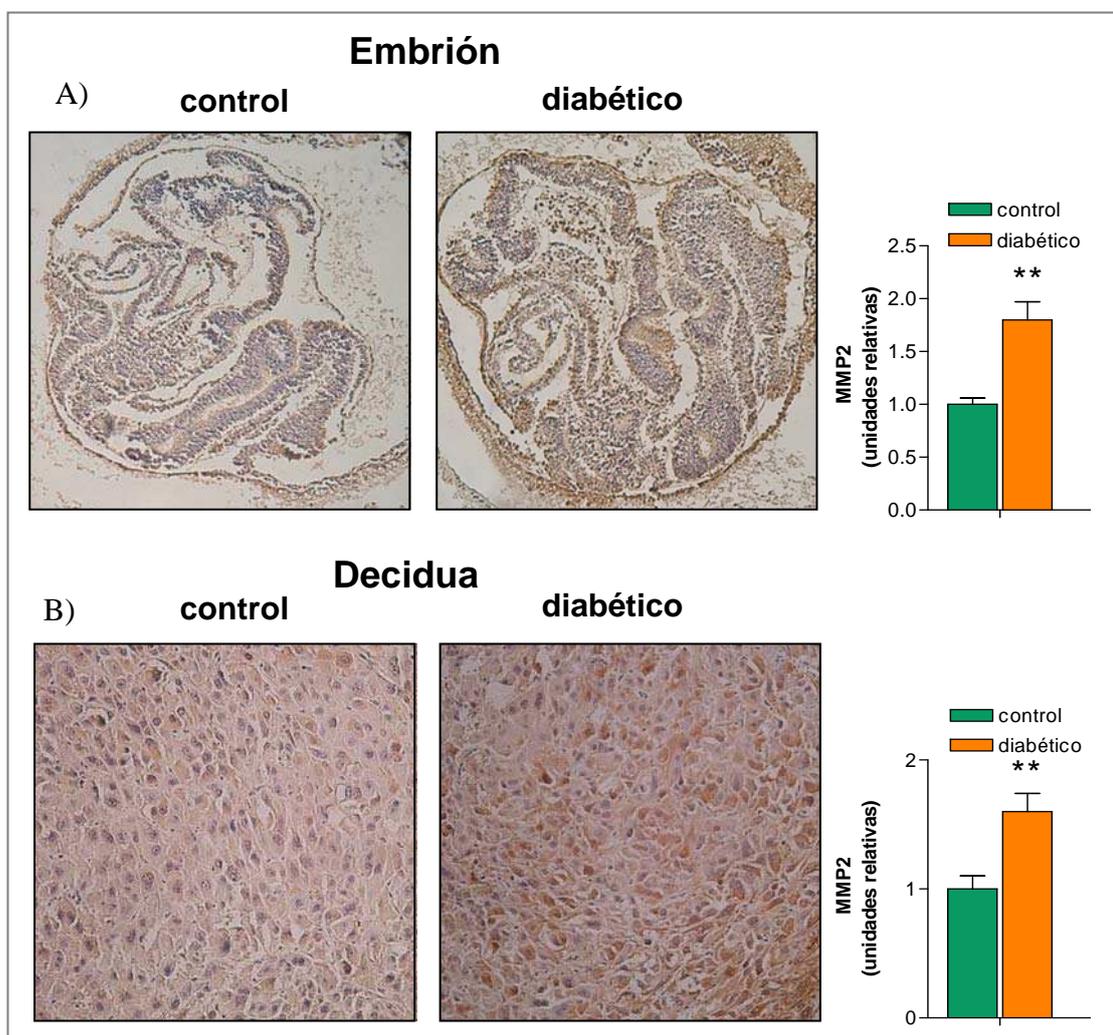


Figura 12. Inmunomarcación representativa y cuantificación de MMP2 en embriones (magnificación original: 100X) (A) y deciduas (magnificación original: 200X) (B) de ratas sanas y diabéticas en el día 10,5 de gestación. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 5 ratas. ** $p < 0,01$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

Actividad de los TIMPs en el embrión y la decidua de rata control y diabética en periodo de organogénesis temprana

La acción de las MMPs se encuentra finamente regulada a nivel postraducciona, tanto su transcripción, como la activación del zimógeno como a través de los inhibidores tisulares de las metaloproteasas (TIMPs) que ejercen una regulación de la actividad de las MMPs uniéndose al sitio activo de la enzima.

Se evaluó la actividad de los TIMPs mediante la inhibición de la actividad de las metaloproteasas en embriones y deciduas de ratas controles y diabéticas en el día 10,5 de gestación utilizando la técnica de zimografía reversa.

Dado que en la bibliografía no están descriptos los TIMPs durante el periodo de organogénesis temprana, en este estudio se determinó la presencia de TIMP1 y TIMP2 a nivel embrionario y decidual.

En la Figura 13 A podemos observar una zimografía reversa representativa que muestra las bandas correspondientes a la actividad de TIMP1 y de TIMP2 en el embrión de rata sana y con diabetes.

En el embrión proveniente de rata diabética, se encontraron incrementadas tanto la actividad de TIMP1 ($p < 0,01$) como de TIMP2 ($p < 0,01$) cuando se comparan estos niveles con los hallados en el embrión proveniente de rata sana (figura 13 B y C).

En la Figura 14 A podemos observar una zimografía reversa representativa que muestra las bandas correspondientes a la actividad de TIMP1 y de TIMP2 en la decidua de rata sana y diabética.

En la decidua de rata diabética también se evidenció un aumento en la actividad de TIMP1 y TIMP2 respecto a los valores obtenidos para la decidua de rata control ($p < 0,05$) (figura 14 B y C).

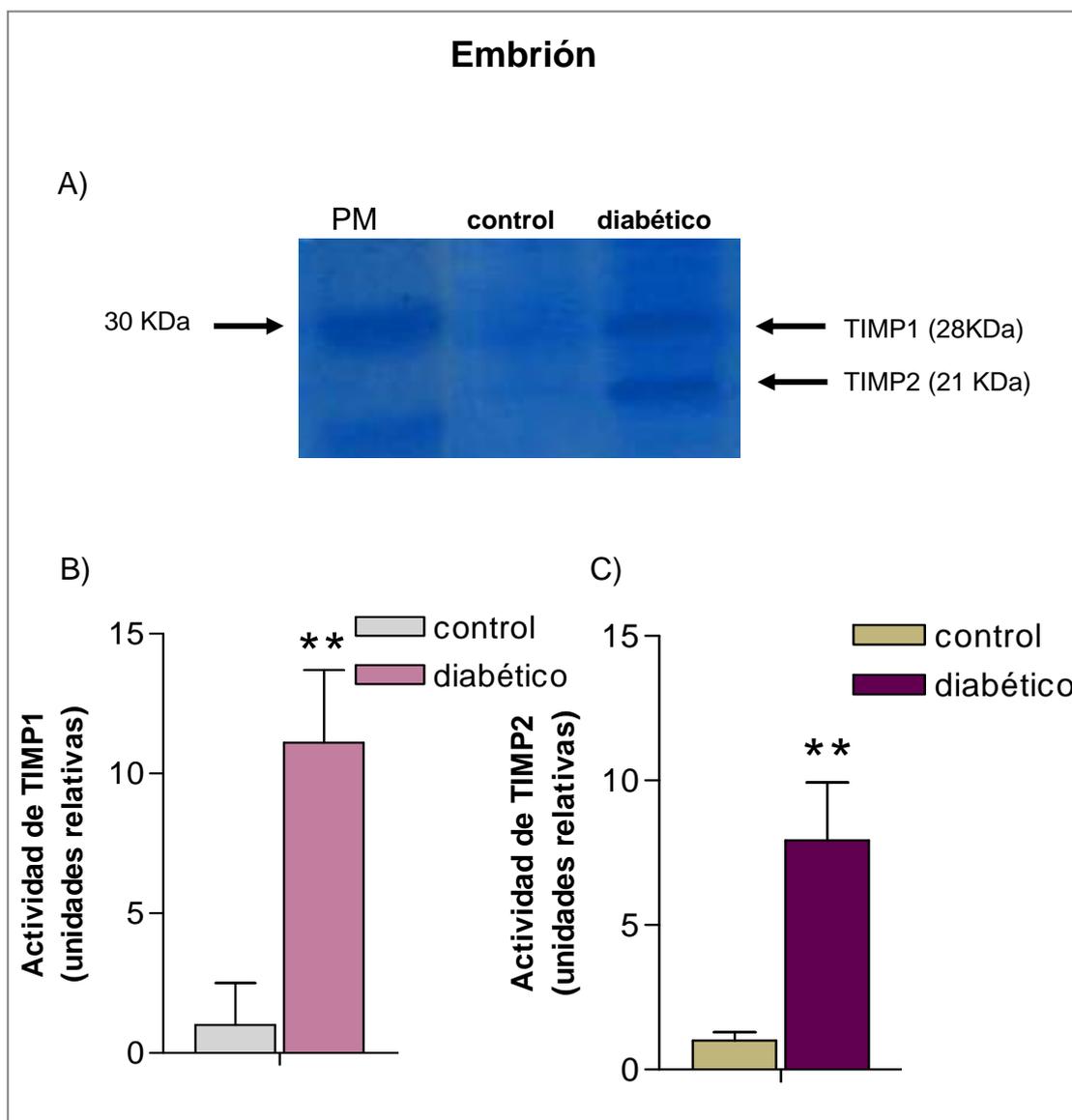


Figura 13. Zimografía reversa representativa (A). Actividad inhibitoria de TIMP1 (B) y TIMP2 (C) en el embrión de ratas sanas y diabéticas en periodo de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. ** $p < 0,01$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

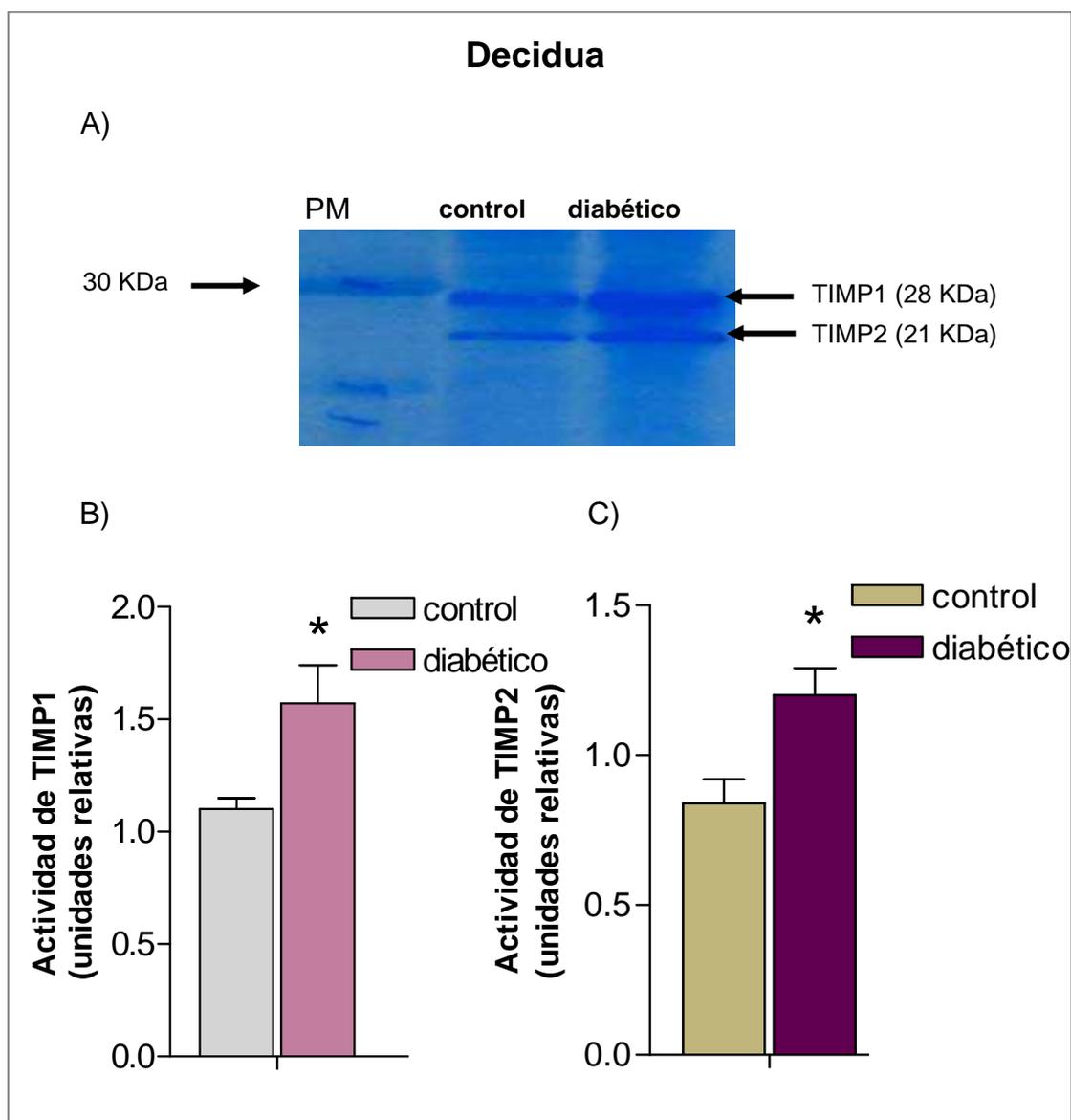


Figura 14. Zimografía reversa representativa (A). Actividad inhibitoria de TIMP1 (B) y TIMP2 (C) en la decidua de ratas sanas y diabéticas en periodo de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. * $p < 0,05$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

Niveles de TIMPs en el embrión y la decidua de rata control y diabética en período de organogénesis temprana

Mediante inmunohistoquímica, se evaluó la localización de TIMP1, TIMP2 y TIMP3 en embriones y deciduas de ratas sanas y diabéticas de día 10,5 de gestación.

TIMP1 se encuentra ampliamente expresado en la organogénesis embrionaria, encontrándose una mayor inmunomarcación en el tubo neural y el corazón, tejidos que se encuentran en intensa remodelación en este período de desarrollo. Su expresión se encuentra incrementada en el embrión de rata diabética cuando se compara con el embrión de rata control ($p < 0,05$) (Figura 15 A).

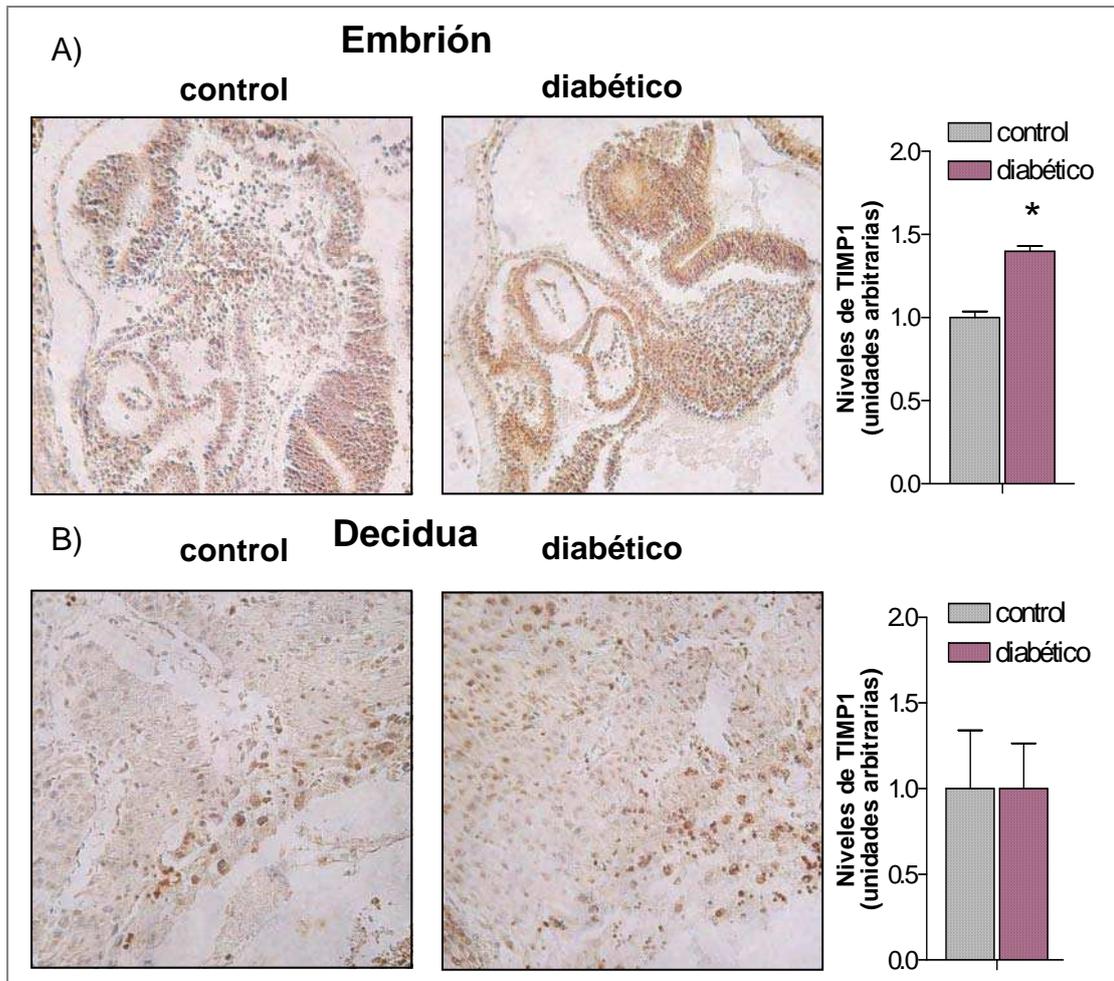


Figura 15. Inmunomarcación representativa y cuantificación de TIMP1 en embrión (magnificación original: 200X) (A) y decidua (magnificación original: 200X) (B) de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 5 ratas. * $p < 0,05$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

En el tejido decidual, se observó inmunomarcación de TIMP1 en las células deciduales y una expresión aún mayor en las células gigantes del trofoblasto, no observándose diferencias al comparar la decidua de rata sana y diabética (Figura 15 B).

Respecto a la inmunomarcación de TIMP2, se observan niveles incrementados de TIMP2 en la región cefálica, cardíaca y caudal del embrión de rata diabética respecto al embrión de rata sana ($p < 0,01$) (Figura 16 A).

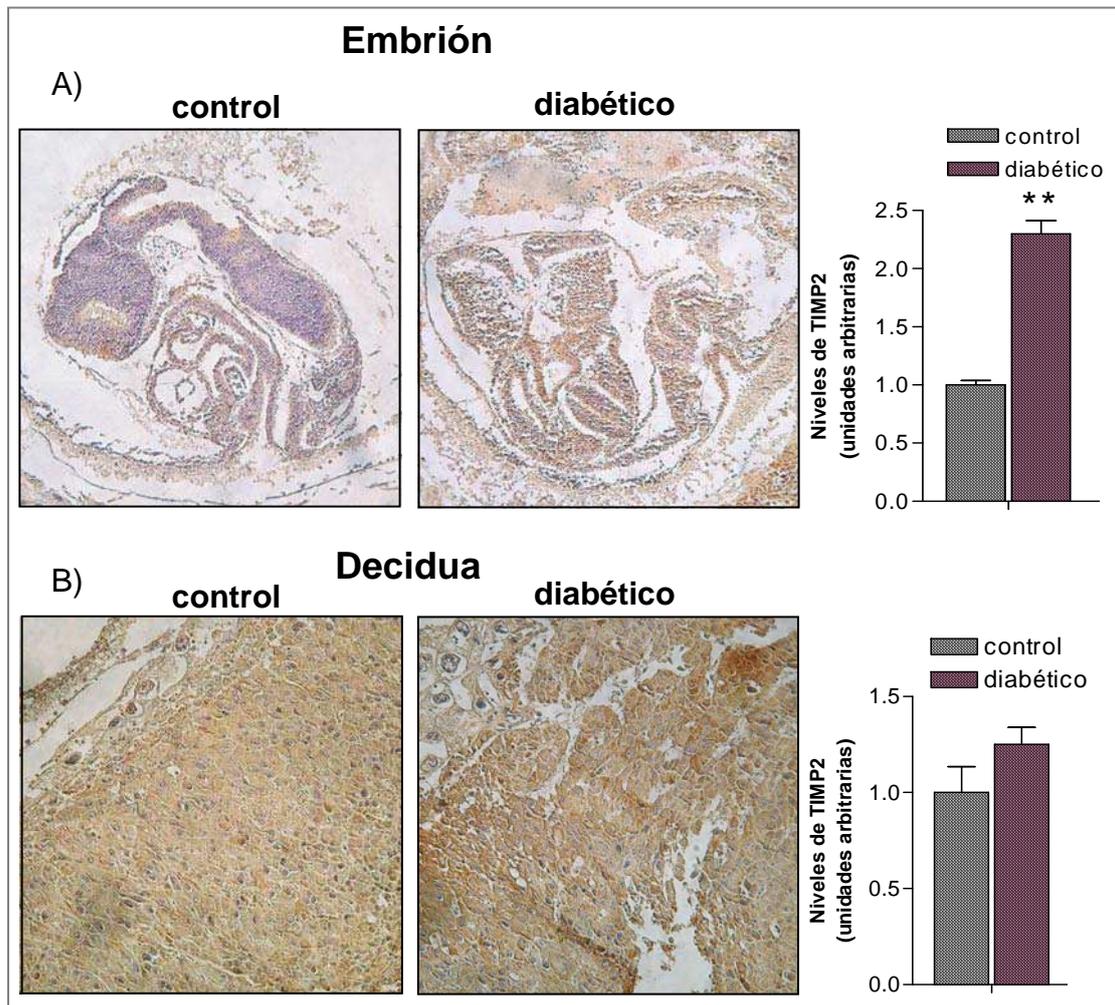


Figura 16. Inmunomarcación representativa y cuantificación de TIMP2 en embrión (magnificación original: 100X) (A) y decidua (magnificación original: 100X) (B) de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 5 ratas. ** $p < 0,01$ comparado con el control. Test estadístico: t de student.

Al evaluar el tejido decidual se observó inmunomarcación de TIMP2 principalmente en las células deciduales. No se observaron diferencias en la

inmunomarcación de TIMP2 en las deciduas de ratas diabéticas respecto a las observadas en las deciduas de las ratas controles (Figura 16 B).

Cuando estudiamos la inmunomarcación para TIMP3, se observaron bajos niveles de esta proteína tanto en los embriones de ratas sanas como diabéticas no detectándose diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (Figura 17 A).

Al evaluar la decidua de rata, se observó que la expresión de TIMP3 se encontraba principalmente en las células gigantes del trofoblasto mientras que la misma era débil en las células deciduales y que no había diferencias en su expresión entre las deciduas de ratas sanas y diabéticas (Figura 17 B).

En el tejido decidual, se realizaron estudios de western blot para cuantificar los niveles de TIMP1, TIMP2 y TIMP3 en las deciduas de ratas sanas y diabéticas.

Se identificó en el tejido decidual tanto por peso molecular como a través de controles positivos a TIMP1 y TIMP2, observándose que TIMP3 se encuentra presente en muy bajas cantidades en la decidua de rata en el día 10,5 de gestación.

Al igual que en los estudios de inmunohistoquímica, no se observaron diferencias significativas en los niveles de TIMP1, TIMP2 o TIMP3 evaluados mediante western blot entre las deciduas de ratas sanas y diabéticas (Figura 18 A, B y C).

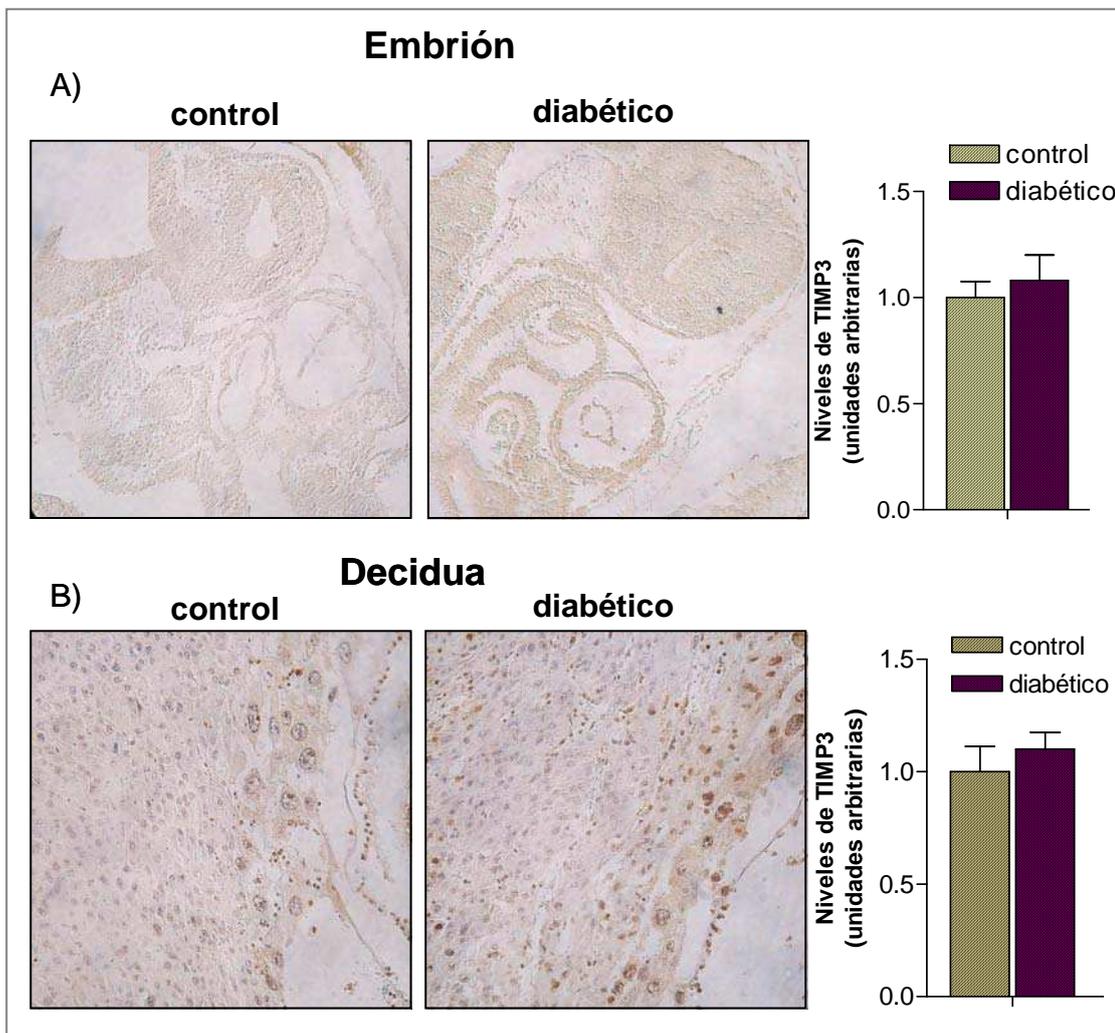


Figura 17. Inmunomarcación representativa y cuantificación de TIMP3 en embrión (magnificación original: 200X) (A) y decidua (magnificación original: 200X) (B) de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 5 ratas. Test estadístico: t de student.

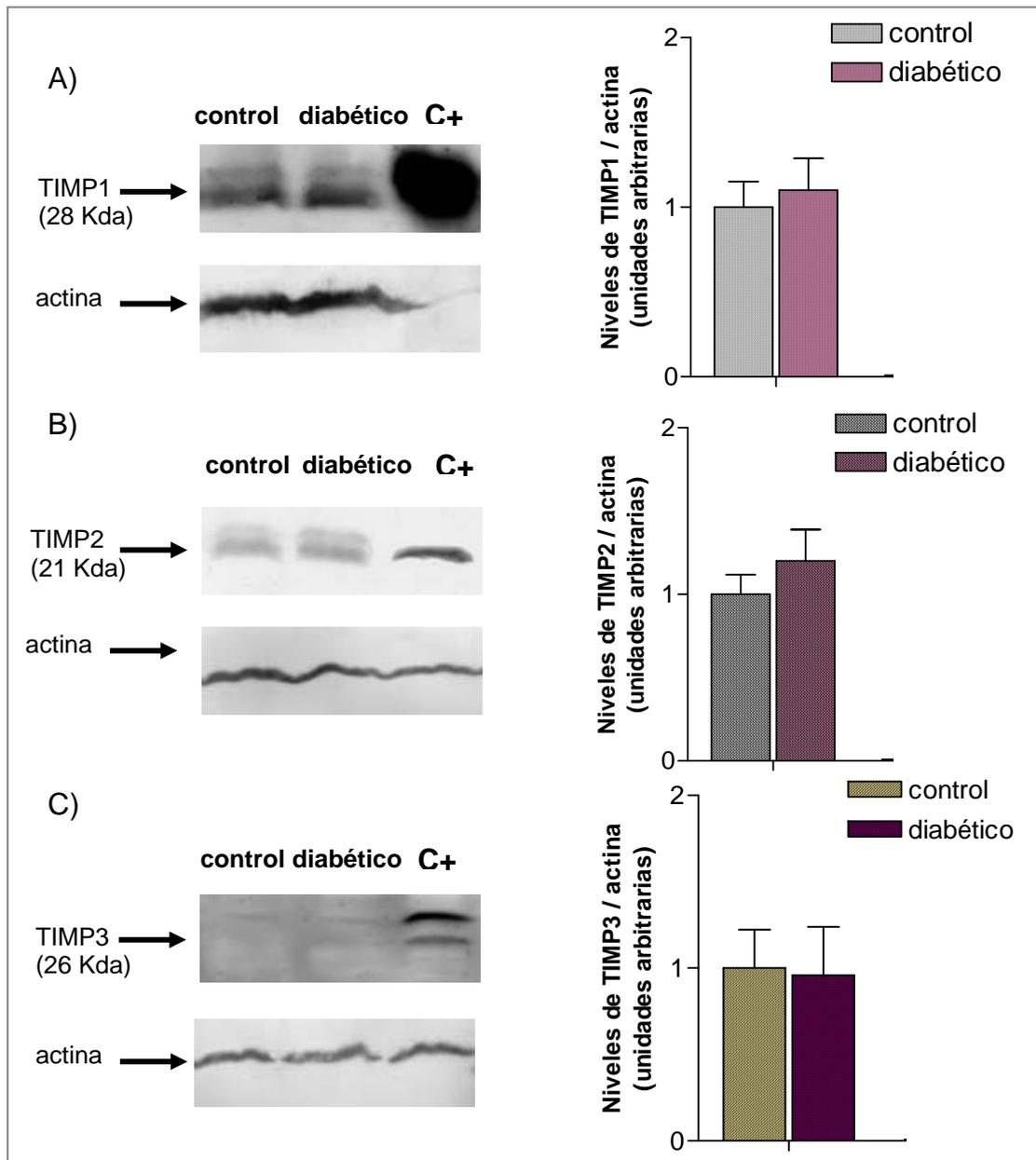


Figura 18. Western blot representativo y cuantificación de TIMP1 (A), TIMP2 (B) y TIMP3 (C) en las deciduas de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 4 ratas. Test estadístico: t de student.

Balance MMPs/TIMPs *in situ* en el embrión y la decidua de rata control y diabética en período de organogénesis temprana

Dada las alteraciones observadas en la actividad de las MMPs y TIMPs en los embriones y deciduas de ratas diabéticas estudiadas en forma

independiente, fue de interés evaluar la actividad metaloproteásica mediante una zimografía *in situ* que evalúa la actividad de MMPs en presencia de los TIMPs y por lo tanto indica el balance MMPs/TIMPs en embriones y deciduas de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana.

Se evaluó el balance MMPs/TIMPs *in situ* en tejido embrionario y decidual congelado mediante la técnica de zimografía *in situ*.

Se observó que existe un incremento en la proporción MMPs/TIMPs en el embrión de rata diabética en comparación con el embrión de rata sana, evidente en las somitas, el tubo neural y el corazón embrionario ($p < 0,01$) (Figura 18 A y B).

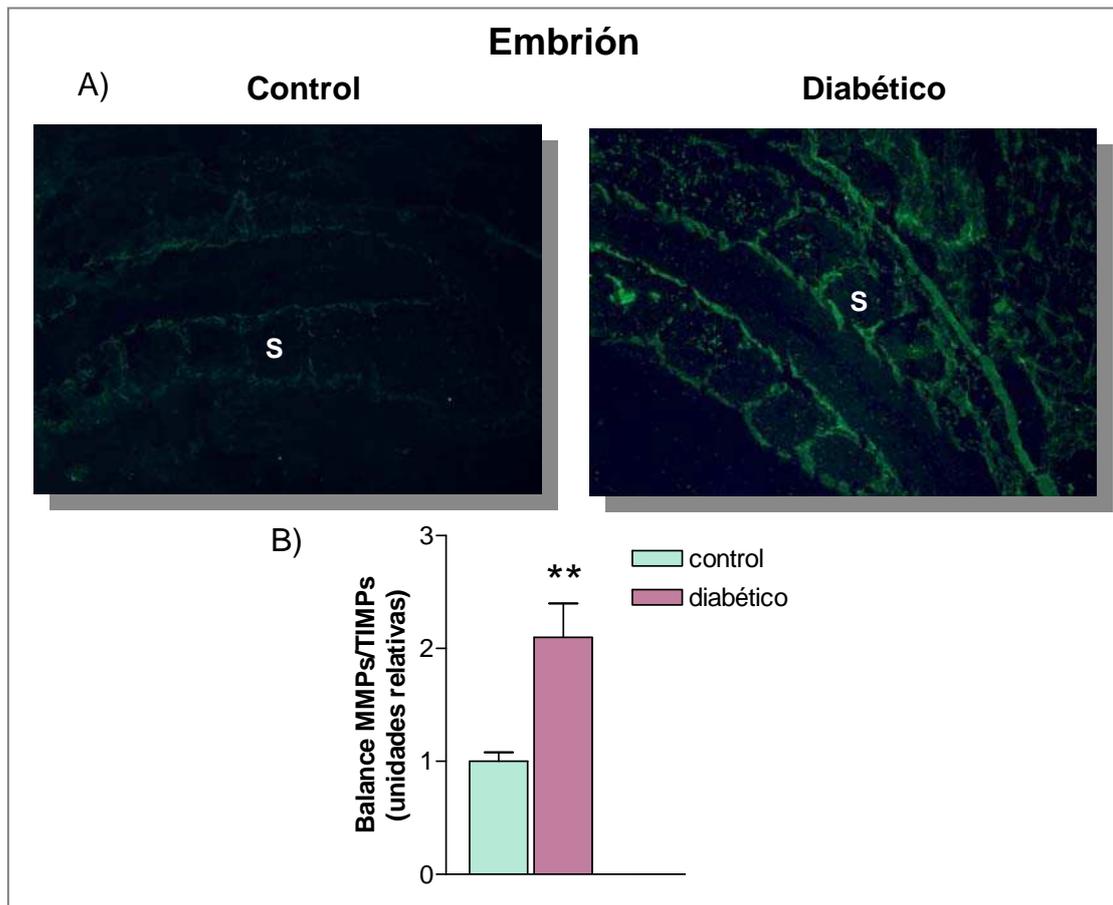


Figura 19. Zimografía *in situ* representativa de embriones de rata sana y diabética (magnificación original: 200X) (A). Cuantificación de la zimografía *in situ* (B). Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 5 ratas. ** $p < 0,01$ comparado con el control. Test estadístico: t de student. S: somitas.

De forma similar, al estudiar el tejido decidual, observamos un importante incremento en la proporción MMPs/TIMPs en las células deciduales y los vasos sanguíneos de las deciduas de ratas diabéticas respecto a las provenientes de ratas sanas ($p < 0,001$) (Figura 20 A y B).

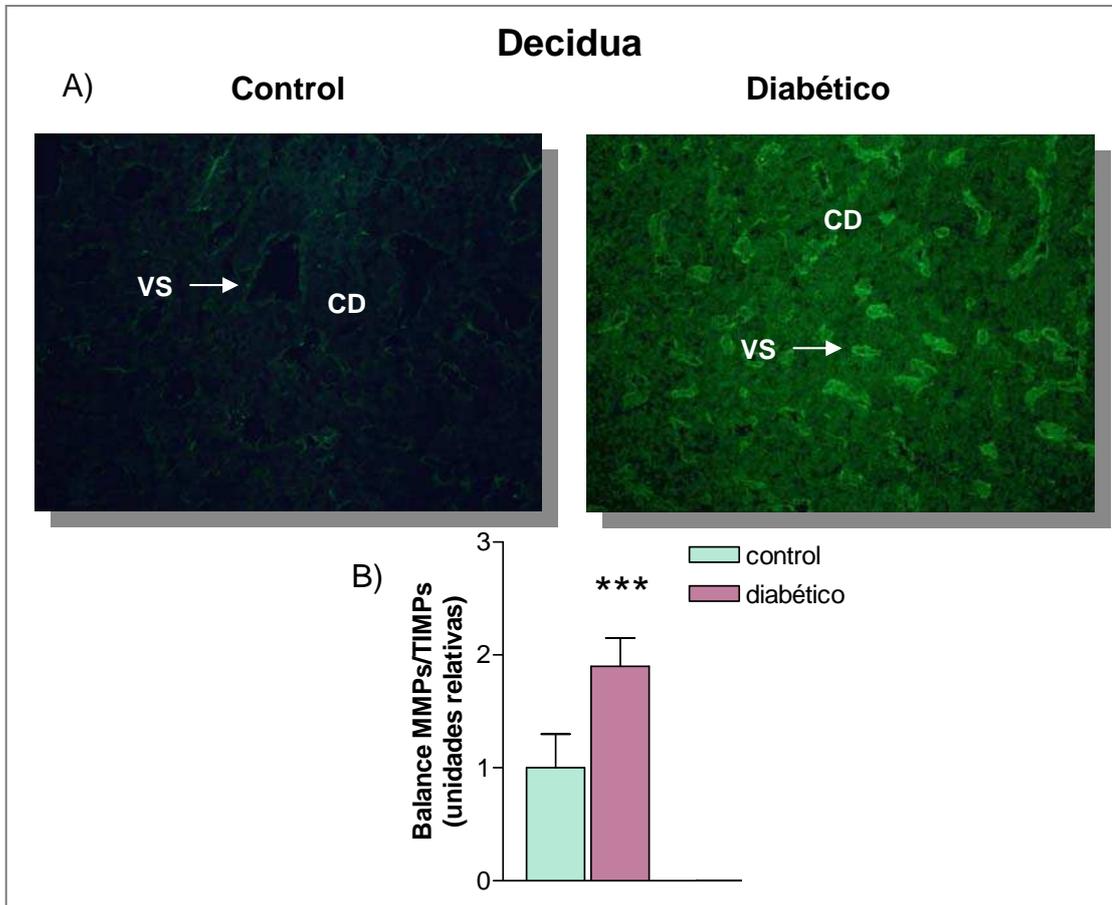


Figura 20, Zimografía *in situ* representativa de deciduas de rata sana y diabética (magnificación original: 100X) (A). Cuantificación de la zimografía *in situ* (B). Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 5 ratas. *** $p < 0,01$ comparado con el control. Test estadístico: t de student. CD: células deciduales; VS: vasos sanguíneos.

Capítulo II

Efecto de la suplementación dietaria con agonistas de PPARs a ratas controles y diabéticas gestantes sobre el embrión y la decidua en el período de organogénesis temprana

Nuestros hallazgos han identificado en el embrión y la decidua de rata diabética importantes alteraciones que marcan un estado de tipo pro-inflamatorio. Además, sabemos que en la diabetes materna existe un déficit de ácidos grasos esenciales, como el ácido araquidónico, ácido graso derivado del ácido linoleico, imprescindible para el desarrollo embrionario (Reece 1999; Cetin y col. 2009). Además, conocemos que tanto el ácido araquidónico como la PGI₂, derivada del mismo y también ciertos ácidos grasos monoinsaturados, como el ácido oleico, activan a los receptores nucleares PPARs que poseen propiedades antiinflamatorias en diferentes tejidos (Forman y col. 1997; Xu y col. 1999). Por ello continuando con este trabajo de tesis se postuló el posible efecto benéfico de la suplementación de la dieta con aceites de cártamo y de oliva, enriquecidas en ácido linoleico y oleico respectivamente en el embrión y la decidua de rata diabética en período de organogénesis temprana.

Se estudió el efecto de la suplementación de la dieta estándar de los animales con 6% de aceite de cártamo o 6% de aceite de oliva suministrado a ratas sanas y diabéticas desde el día 0,5 al 10,5 de gestación.

Glucemia e ingesta materna, parámetros de crecimiento embrionario y tasa de reabsorción y malformación embrionaria en ratas controles y diabéticas en etapa de organogénesis temprana

Ratas sanas y diabéticas fueron sometidas desde el día 0,5 al 10,5 de gestación a los siguientes tratamientos dietarios: a) dieta estándar o control, b) dieta estándar suplementada con 6% de aceite de oliva, rica en ácidos grasos monoinsaturados y c) dieta estándar suplementada con 6 % de aceite de cártamo, rica en ácidos grasos poliinsaturados, para luego estudiar la glucemia y la ingesta energética materna, parámetros de crecimiento embrionario y la tasa de reabsorción y malformación embrionaria. El contenido nutricional de las dietas ha sido detallado en la sección Materiales y Métodos.

Pudimos observar que los tratamientos dietarios no modifican los valores de glucemia de las ratas sanas ni de las ratas diabéticas (Tabla III).

En cuanto a la ingesta energética, se observó que la misma no se ve modificada por las diferentes dietas en las ratas sanas. En las ratas diabéticas alimentadas con la dieta estándar, el consumo calórico materno se encuentra incrementado respecto al de las ratas controles ($p < 0,001$) y se observó que las dietas suplementadas con aceite de oliva y de cártamo no modifican dicho parámetro.

Al estudiar el contenido proteico embrionario, índice de crecimiento, se observó que las dietas no ejercen efecto sobre este parámetro en los embriones provenientes de ratas sanas. Por el contrario, en el embrión de rata diabética alimentada con dieta estándar donde se observa una disminución en el contenido proteico, tanto la suplementación de la dieta de los animales con aceite de oliva ($p < 0,05$) como con aceite de cártamo ($p < 0,05$) logran incrementar este parámetro de crecimiento embrionario (Tabla III).

	Dieta estándar		Dieta estándar suplementada con 6% de aceite de oliva		Dieta estándar suplementada con 6% de aceite de cártamo		ANOVA 2X2
	Control	Diabético	Control	Diabético	Control	Diabético	
Glucemia materna (mg/dl)	103±10 ^a	401±30 ^b	91±30 ^a	357±31 ^b	90±40 ^a	356±25 ^b	Dieta : NS Diabetes: p<0,001 Interacción: NS
Ingesta energética (Kcal/día)	65±1 ^a	89±8 ^b	60±2 ^a	94±7 ^b	63±7 ^a	103±8 ^b	Dieta : NS Diabetes: p<0,001 Interacción: NS
Contenido proteico embrionario (µg)	58±4,9 ^a	29±3,1 ^b	50±2,2 ^a	37±2,2 ^c	49±2,6 ^a	39±1,2 ^c	Dieta : NS Diabetes: p<0,001 Interacción: p<0,001
Número de somitas por embrión	13±0,2 ^a	11±0,3 ^b	13±0,1 ^a	11±0,2 ^b	13±0,2 ^a	12±0,2 ^c	Dieta : p<0,05 Diabetes: p<0,001 Interacción: p<0,05

Tabla III. Efecto de la suplementación dietaria con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la glucemia, ingesta energética materna y parámetros de crecimiento embrionario de ratas sanas y diabéticas en el periodo de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio ± error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 14 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas (p<0,05).

El número de somitas, índice de desarrollo embrionario, permanece inalterado en los embriones de ratas sanas tratadas con los diferentes suplementos dietarios respecto al embrión de rata sana alimentada con la dieta estándar. En cambio, en el embrión de rata diabética alimentada con dieta estándar el número de somitas se encuentra disminuido y mientras la suplementación dietaria con aceite de oliva no modifica este parámetro, la administración de la dieta enriquecida en aceite de cártamo es capaz de incrementar el número de somitas (p<0,01) (Tabla III).

En los embriones de ratas sanas, el porcentaje de reabsorciones embrionarias no se ve alterado por las dietas enriquecidas en agonistas de PPARs, mientras que en los embriones de rata diabética alimentada con la

dieta estándar, la tasa de reabsorciones se encuentra incrementada y se reduce en forma importante tanto con el tratamiento con el suplemento dietario con aceite de oliva ($p < 0,001$) como con el de aceite de cártamo ($p < 0,001$) (Tabla IV).

La tasa de malformaciones embrionarias en las ratas sanas no se ve alterada con los tratamientos dietarios consistentes en la suplementación del alimento con aceite de oliva y cártamo. Por el contrario, tanto la dieta enriquecida en aceite de oliva ($p < 0,05$) como en aceite de cártamo ($p < 0,05$) fueron capaces de reducir en un 50 % el porcentaje de malformaciones embrionarias que se encuentra aumentado en el embrión de rata diabética alimentada con dieta estándar (Tabla IV).

	Dieta estándar		Dieta estándar suplementada con 6% de aceite de oliva		Dieta estándar suplementada con 6% de aceite de cártamo		Chi cuadrado
	Control	Diabético	Control	Diabético	Control	Diabético	
Número de reabsorciones (%)	11/170 ^a (6,5%)	91/253 ^b (35,9%)	24/213 ^a (11,3%)	18/173 ^a (10,3%)	19/199 ^a (9,6%)	27/224 ^a (12,1%)	$p < 0,001$
Número de malformaciones (%)	3/159 ^a (1,9%)	23/162 ^b (14,2%)	3/189 ^a (1,6%)	10/155 ^c (6,4%)	2/180 ^a (1,1%)	14/197 ^c (7,1%)	$p < 0,001$

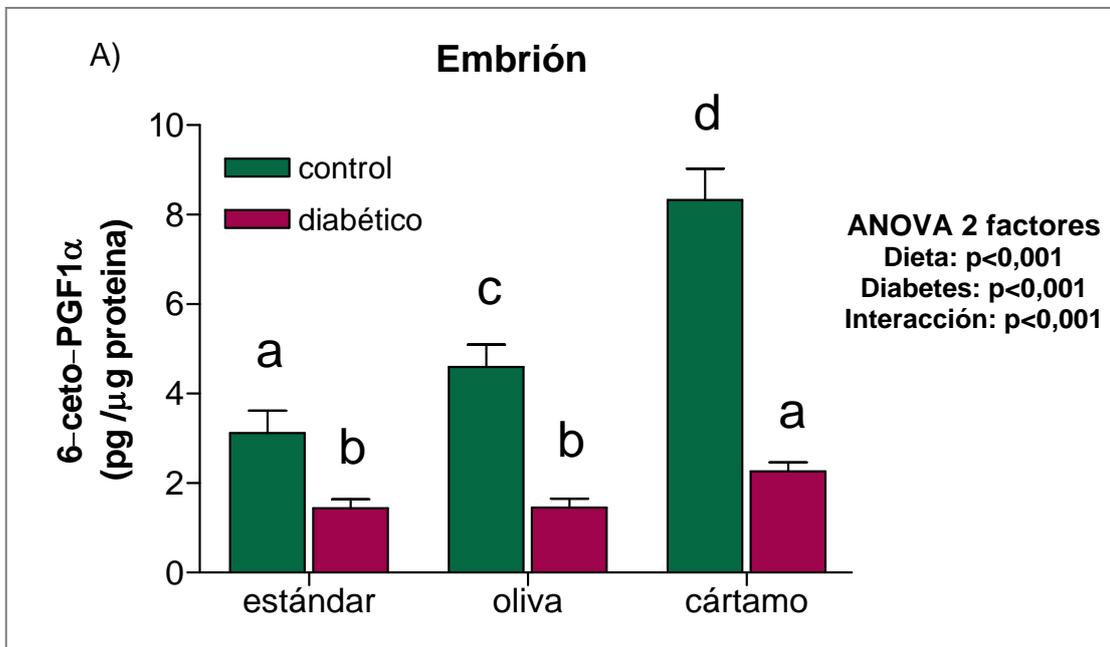
Tabla IV. Efecto de la suplementación dietaria con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la tasa de reabsorción y de malformación embrionaria en ratas sanas y diabéticas durante el período de organogénesis temprana. Los datos de número de reabsorciones expresan el número de reabsorciones / total de sitios de implantación y los datos de número de malformaciones expresan el número de embriones malformados / total de embriones viables. Test estadístico: chi cuadrado. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Niveles de PGI₂ en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

Dados nuestros resultados que muestran la importancia de PGI₂ en el período de organogénesis temprana y sus niveles alterados en el embrión

y la decidua de rata diabética, se estudió en el día 10,5 de gestación la producción de PGI_2 , a través del dosaje de su metabolito estable, 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ en el embrión y la decidua de ratas controles y diabéticas que fueron alimentadas desde el día 0,5 al 10,5 de gestación con diferentes dietas: a) dieta estándar o control, b) dieta estándar suplementada con 6% de aceite de oliva y c) dieta estándar suplementada con 6 % de aceite de cártamo.

Pudimos observar que en el embrión de rata control, tanto la suplementación dietaria con el aceite de oliva ($p < 0,05$) como la suplementación con el aceite de cártamo ($p < 0,001$) incrementan los niveles de PGI_2 cuando se comparan dichos valores con aquellos dosados en el embrión de rata sana alimentada con la dieta estándar (Figura 21 A). Si bien no se observan modificaciones en los niveles de PGI_2 embrionario al suplementar la dieta de las ratas diabéticas con el aceite de oliva, la dieta enriquecida con el aceite de cártamo fue capaz de incrementar en los embriones de rata diabética los niveles de PGI_2 ($p < 0,05$) que se hallan disminuidos en el embrión de rata diabética alimentada con dieta estándar (Figura 21 A).



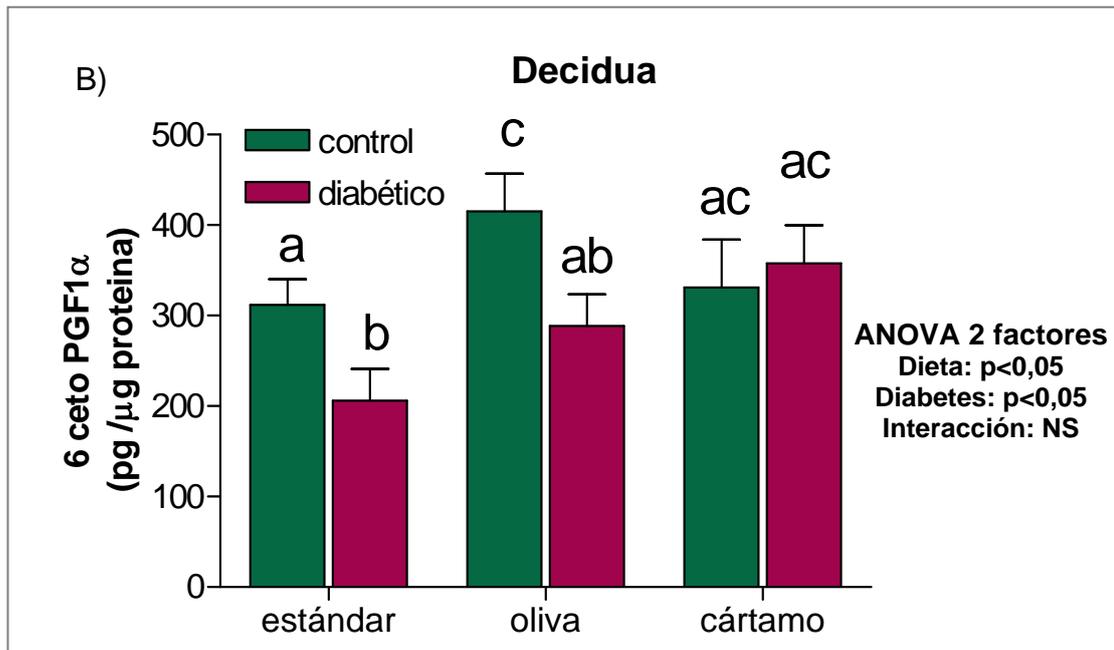


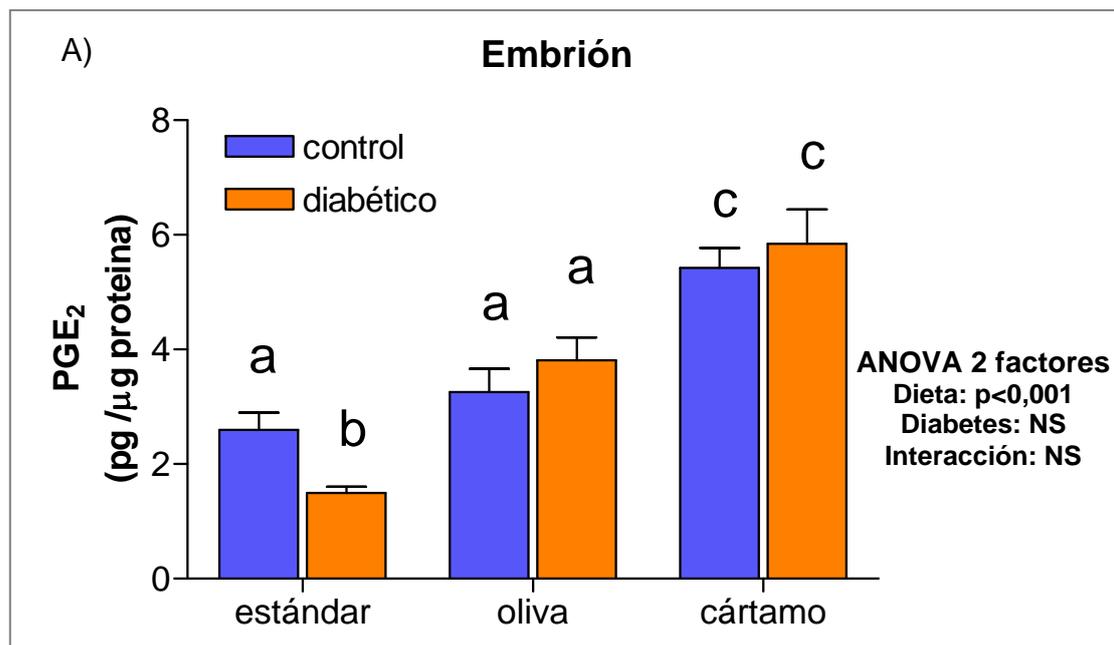
Figura 21. Efecto de la suplementación dietaria con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre los niveles de PGI₂ en el embrión (A) y la decidua (B) de rata sana y diabética en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio ± error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas (p<0,05).

Al estudiar la producción de PGI₂ en el tejido decidual que rodea y nutre al embrión en esta etapa del desarrollo, se observó que en la decidua proveniente de ratas controles, la dieta suplementada con el aceite de oliva fue capaz de incrementar los niveles de PGI₂ (p<0,05) cuando se compara con la decidua de rata sana alimentada con dieta estándar, no habiéndose observado diferencias entre los niveles de PGI₂ en embriones de ratas sanas alimentadas con la dieta estándar en relación a la dieta enriquecida en aceite de cártamo (Figura 21 B). En la decidua de rata diabética alimentada con dieta estándar, los valores de PGI₂ se encuentran disminuidos y si bien la dieta rica en aceite de oliva sólo muestra una tendencia hacia el incremento de los niveles de dicha prostaglandina, la dieta suplementada con aceite de cártamo incrementa significativamente la producción de PGI₂ (p<0,05) (Figura 21 B).

Niveles de PGE₂ en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

Dada la relevancia de la PGE₂ como morfógeno, los niveles alterados de esta prostaglandina evidenciadas en el embrión y la decidua de rata diabética, se estudió en el día 10,5 de gestación la producción de PGE₂ en el embrión y la decidua de ratas controles y diabéticas alimentadas desde el día 0,5 al 10,5 de gestación con diferentes dietas: a) dieta estándar o control, b) dieta estándar suplementada con 6% de aceite de oliva, rica en ácido oleico y c) dieta estándar suplementada con 6 % de aceite de cártamo, rica en ácido linoleico.

Se observó que en los embriones provenientes de ratas sanas, el tratamiento dietario consistente en la suplementación de la dieta con el aceite de oliva no modificó los niveles de PGE₂, pero la concentración de dicho prostanoides se incrementó al suplementar la dieta estándar con el aceite de cártamo ($p < 0,001$) (Figura 22 A). En los embriones de ratas diabéticas donde los niveles de PGE₂ se encuentran disminuidos en relación al control al alimentar las ratas gestantes con la dieta estándar, pudimos observar que tanto la dieta enriquecida con aceite de oliva ($p < 0,01$) como con aceite de cártamo ($p < 0,001$) logran incrementar la concentración de este prostanoides (Figura 22 A).



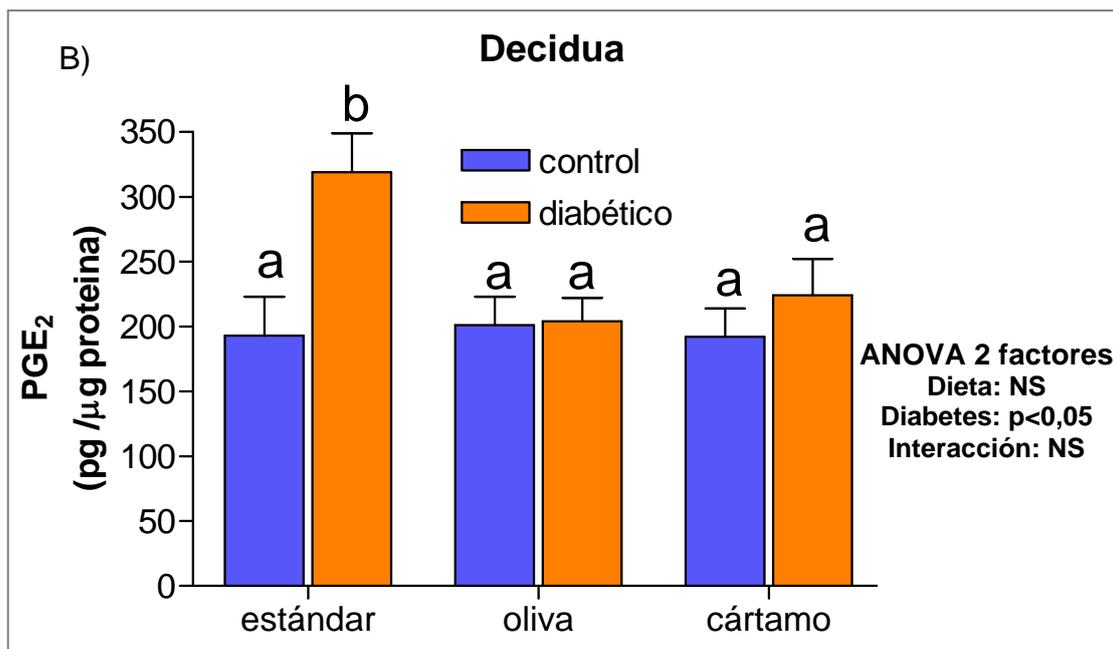


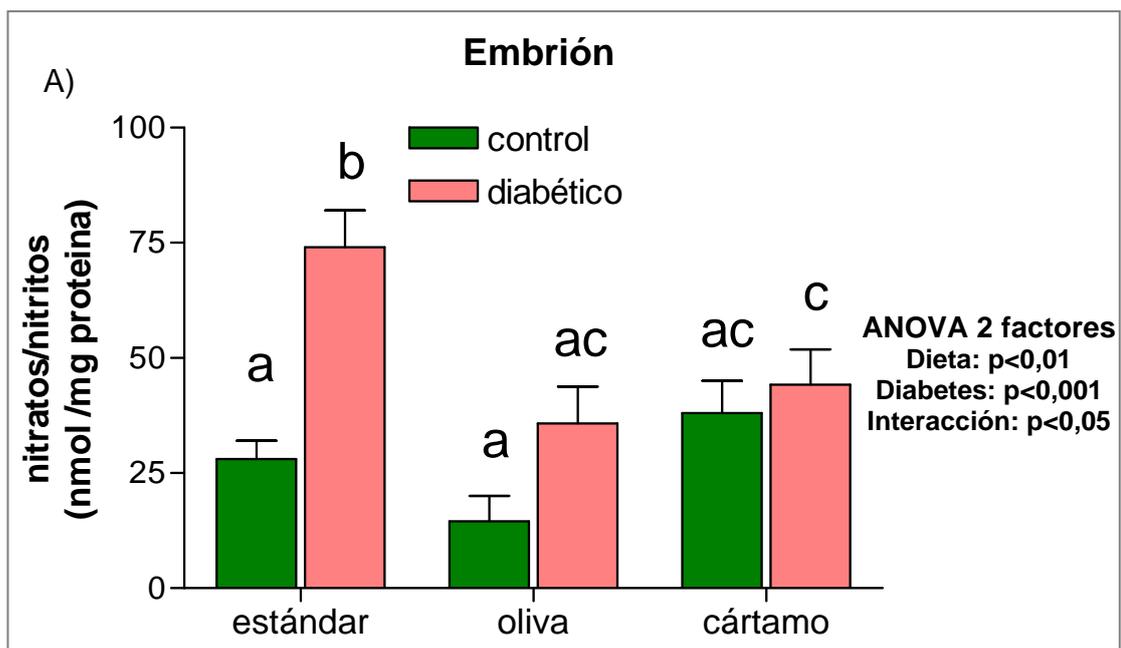
Figura 22. Efecto de la suplementación dietaria con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre los niveles de PGE₂ en el embrión (A) y la decidua (B) de rata sana y diabética en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio ± error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas (p<0,05).

También se evaluó la concentración de PGE₂ en el tejido decidual, observándose que en la decidua de ratas sanas las dietas suplementadas con los agonistas de PPARs no afectan los niveles de esta prostaglandina. En forma interesante, en la decidua de ratas diabéticas alimentadas con la dieta estándar donde la PGE₂ se encuentra incrementada en relación al control, tanto la dieta suplementada con el aceite de oliva (p<0,01) como con el aceite de cártamo (p<0,05) son capaces de disminuir a valores normales los niveles de PGE₂ (Figura 22 B).

Producción de óxido nítrico en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

Considerando la función de NO como morfógeno y la sobreproducción de NO que presentan los embriones y las deciduas de rata diabética durante la organogénesis temprana, se evaluó en el día 10,5 de gestación los niveles de nitratos/nitritos, índice de la producción de óxido nítrico, en el embrión y la decidua de ratas controles y diabéticas alimentadas desde el día 0,5 al 10,5 de gestación con los siguientes tratamientos dietarios: a) dieta estándar o control, b) dieta estándar suplementada con 6% de aceite de oliva y c) dieta estándar suplementada con 6 % de aceite de cártamo.

Observamos que en el embrión de rata sana, los niveles de nitratos/nitritos no se ven modificados por los tratamientos dietarios con agonistas de PPARs (Figura 23 A). Cuando evaluamos el embrión de rata diabética, encontramos que ambas dietas enriquecidas con agonistas de PPARs, la suplementada con el aceite de oliva ($p < 0,01$) y la suplementada con el aceite de cártamo ($p < 0,05$) fueron capaces de disminuir los niveles de nitratos/nitritos que se hallan aumentados en la rata diabética alimentada con la dieta estándar en relación al control (Figura 23 A).



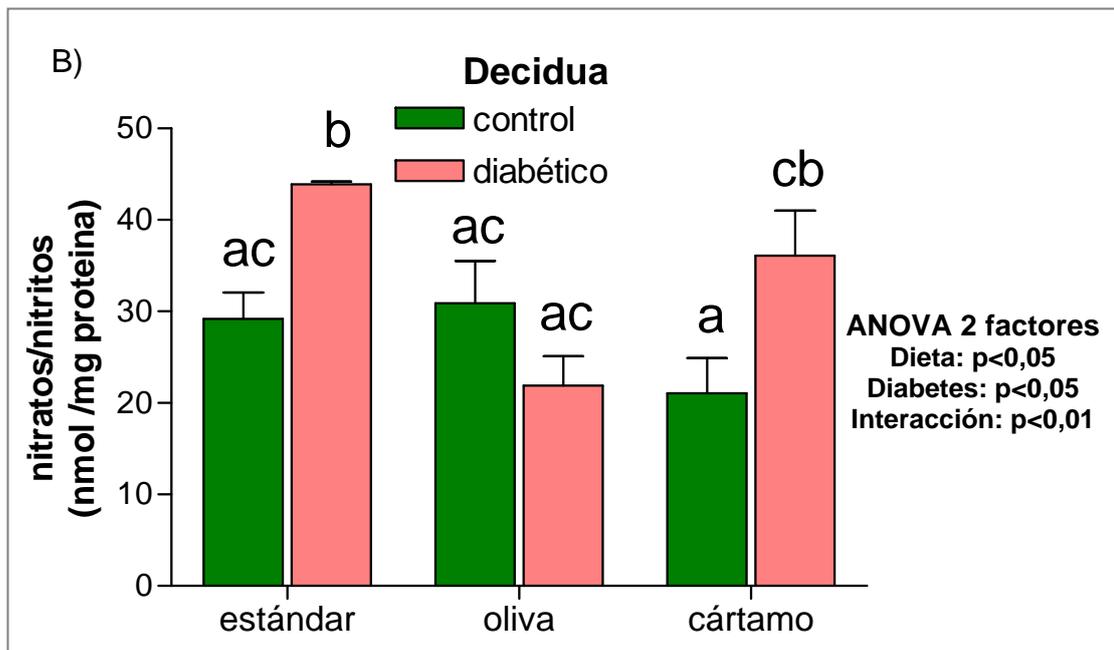


Figura 23. Efecto de la suplementación dietaria con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la producción de NO en el embrión (A) y la decidua (B) de rata sana y diabética en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al evaluar las deciduas, observamos que mientras que los tratamientos dietarios no ejercen efecto sobre los niveles de nitratos/nitritos en las deciduas de las ratas controles, en el tejido decidual proveniente de ratas diabéticas, la dieta suplementada con el aceite de oliva redujo los niveles de nitratos/nitritos a valores semejantes a aquellos observados en el tejido control ($p < 0,001$) (figura 23 B), si bien no se observaron diferencias en la producción de NO entre las deciduas de ratas diabéticas alimentadas con dieta estándar y con la dieta estándar suplementada con el aceite de cártamo (figura 23 B).

Niveles de peroxidación lipídica en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

Dado que la elevada producción de especies reactivas del oxígeno es teratogénico durante la organogénesis embrionaria y que se encuentra elevada la lipoperoxidación lipídica en los embriones y deciduas de ratas diabéticas, se evaluó en el día 10,5 de gestación los niveles de isoprostanos en el embrión y de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en la decidua de ratas controles y diabéticas sometidas desde el día 0,5 al 10,5 de gestación a los siguientes tratamientos dietarios: a) dieta estándar o control, b) dieta estándar suplementada con 6% de aceite de oliva, rica en ácidos grasos monoinsaturados y c) dieta estándar suplementada con 6 % de aceite de cártamo, rica en ácidos grasos poliinsaturados.

Los niveles de isoprostanos, sensible índice de peroxidación lipídica, se incrementaron en los embriones al suplementar la dieta estándar de las ratas sanas con el aceite de oliva ($p < 0,05$) y con el aceite de cártamo ($p < 0,05$) (Figura 24 A). En los embriones de ratas diabéticas alimentadas con dieta estándar, donde son mayores los niveles de isoprostanos respecto a los embriones de ratas controles, la dieta rica en aceite de oliva fue capaz de reducir los niveles de este índice de peroxidación lipídica ($p < 0,05$), no observándose efecto con el tratamiento dietario enriquecido con el aceite de cártamo (Figura 24 A).

Al estudiar el efecto de los tratamientos dietarios sobre los niveles de TBARS en la decidua de las ratas controles, observamos que la peroxidación lipídica no es afectada por la suplementación dietaria con los aceites de oliva y cártamo (Figura 24 B). Sin embargo, la peroxidación lipídica, incrementada en las deciduas provenientes de ratas diabéticas alimentadas con la dieta estándar en relación al control disminuye significativamente con el tratamiento *in vivo* consistente en la suplementación dietaria con el aceite de oliva y de cártamo ($p < 0,001$) (Figura 24 B).

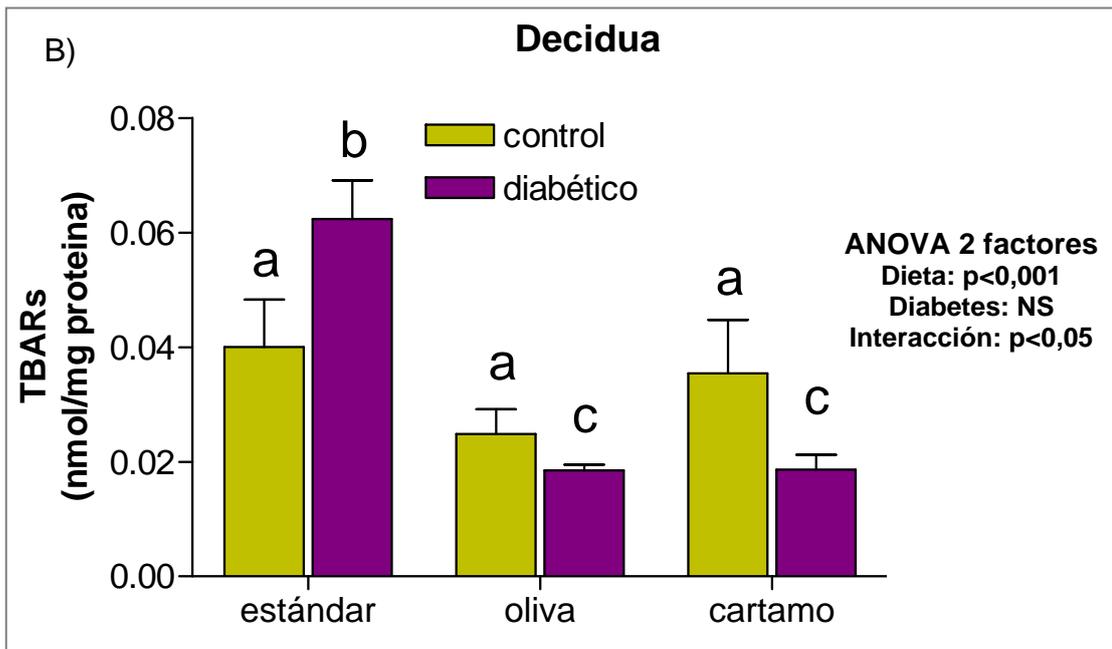
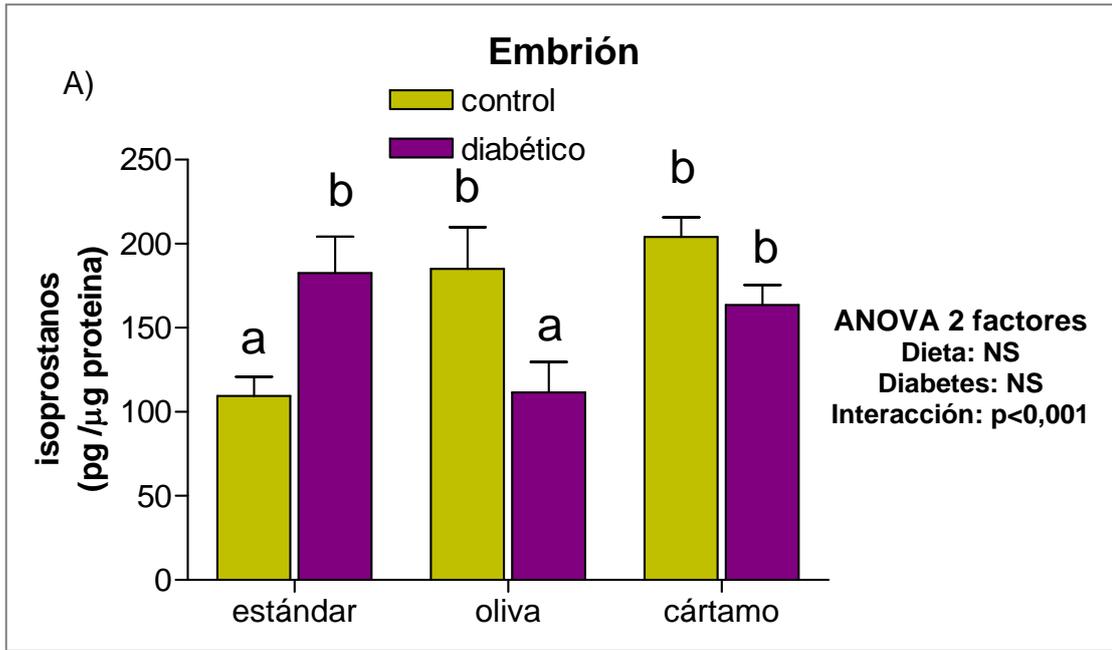


Figura 24. Efecto de la suplementación dietaria con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre los niveles de isoprostanos en el embrión (A) y TBARs en la decidua (B) de rata sana y diabética en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas (p<0,05).

Actividad de las metaloproteasas en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

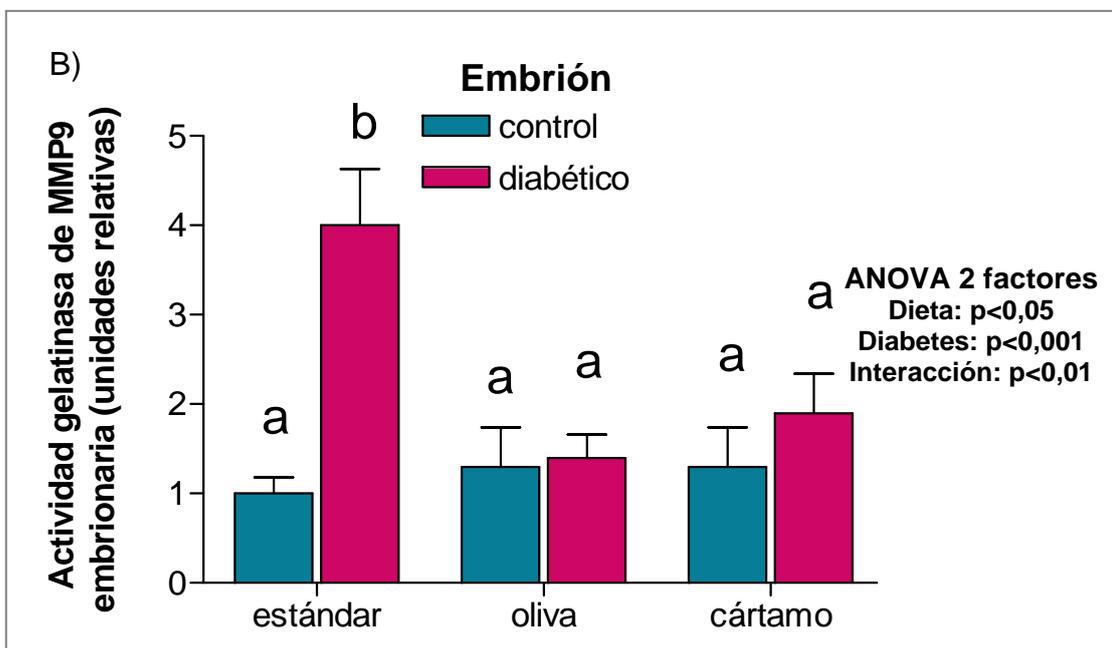
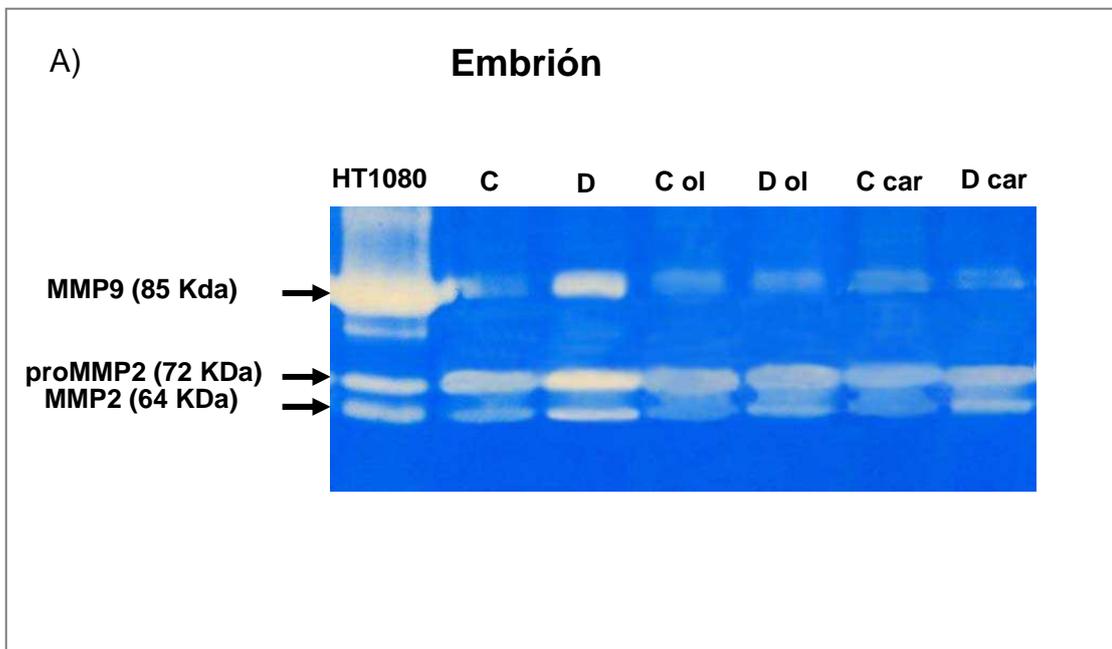
Dada la relevancia de las MMPs en el proceso de remodelación propia de los eventos de desarrollo embrionario (Vu y Werb 2000) y las alteraciones observadas al evaluar la actividad de las MMPs en embriones y deciduas de ratas diabéticas, se evaluó en el día 10,5 de gestación la actividad de la MMP9 y MMP2 en ratas sanas y diabéticas alimentadas desde el día 0,5 al 10,5 de gestación con las siguientes dietas: a) dieta estándar o control, b) dieta estándar suplementada con 6% de aceite de oliva y c) dieta estándar suplementada con 6 % de aceite de cártamo.

En la Figura 25 A se observa en una zimografía representativa, las bandas correspondientes a la actividad gelatinolítica de la MMP9, proMMP2 y MMP2 del medio condicionado de células HT1080 utilizado como control positivo y de embriones provenientes de ratas sanas y con diabetes alimentadas con una dieta estándar, enriquecida en aceite de oliva o cártamo.

Al evaluar la actividad de las MMPs en los embriones provenientes de ratas sanas, observamos que la administración de las dietas suplementadas no modifican la actividad de la MMP9 (Figura 25 B). Por el contrario, en los embriones de rata diabética, donde se observa un incremento en la actividad de la MMP9 respecto a los embriones de ratas sanas alimentadas con la dieta estándar, observamos que tanto la dieta enriquecida en aceite de oliva ($p < 0,05$) como en aceite de cártamo ($p < 0,05$) redujeron la actividad de dicha enzima a valores similares a los observados en el tejido control (Figura 25 B).

La actividad de la proMMP2 en los embriones de ratas sanas disminuyó al tratar *in vivo* los animales con la dieta suplementada con el aceite de oliva ($p < 0,05$) (Figura 24 C). La actividad de la forma latente de la MMP2, aumentada en los embriones provenientes de ratas diabéticas alimentadas con la dieta estándar respecto a los embriones de ratas controles, también se redujo tanto con la suplementación de la dieta estándar con el aceite de oliva ($p < 0,001$) como con el aceite de cártamo ($p < 0,001$) (Figura 25 C).

Cuando estudiamos la actividad de la MMP2 en los embriones de ratas sanas, observamos que al suministrar a los animales las dietas enriquecidas en aceite de oliva ($p < 0,01$) y en aceite de cártamo ($p < 0,01$) disminuyó la actividad de dicha enzima. En los embriones provenientes de ratas diabéticas observamos que la MMP2, cuya actividad se encuentra incrementada en los embriones de rata diabética alimentadas con el alimento estándar en relación al control, se redujo en forma importante con la suplementación de la dieta con el aceite de oliva ($p < 0,05$) y con el aceite de cártamo ($p < 0,05$) observándose bajo estas dietas valores similares a los observados en el tejido sano (Figura 25 D).



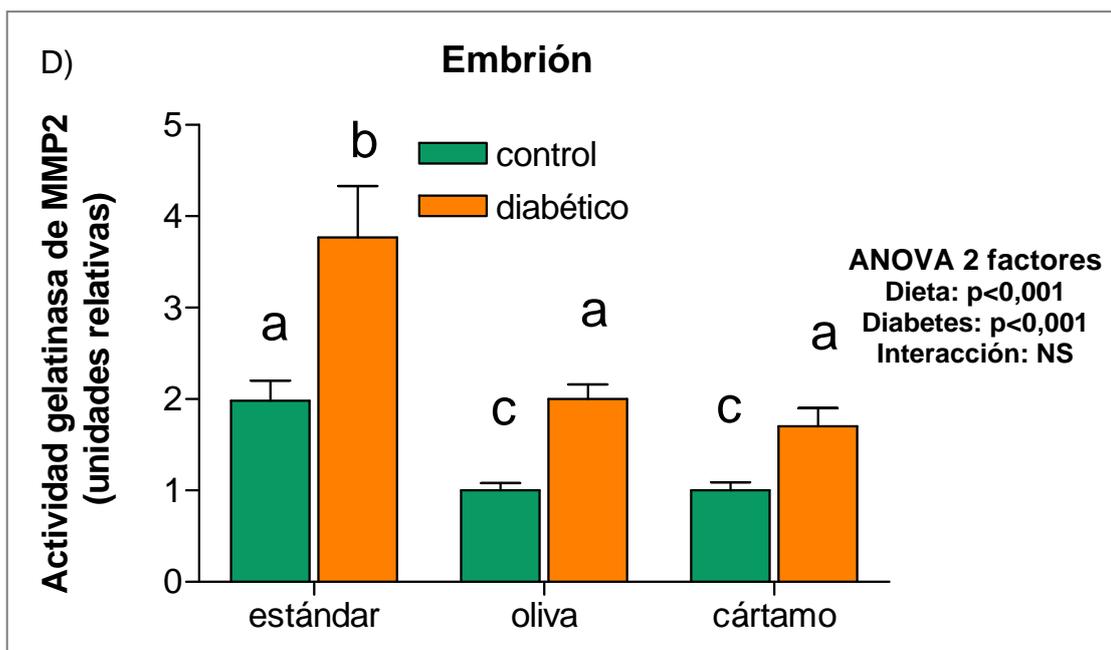
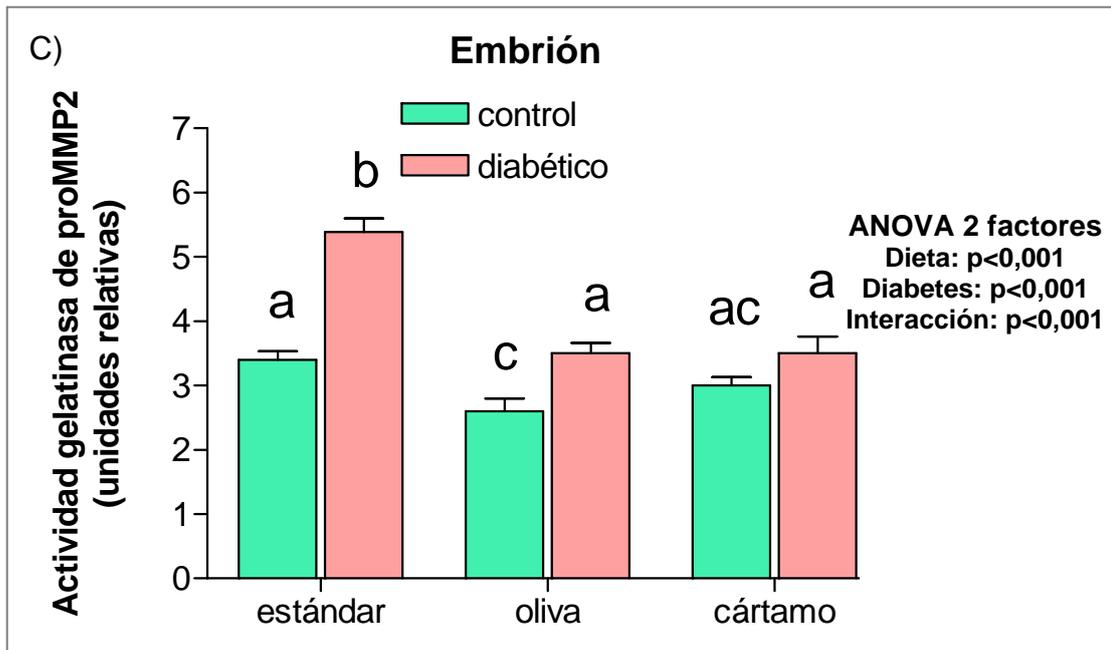


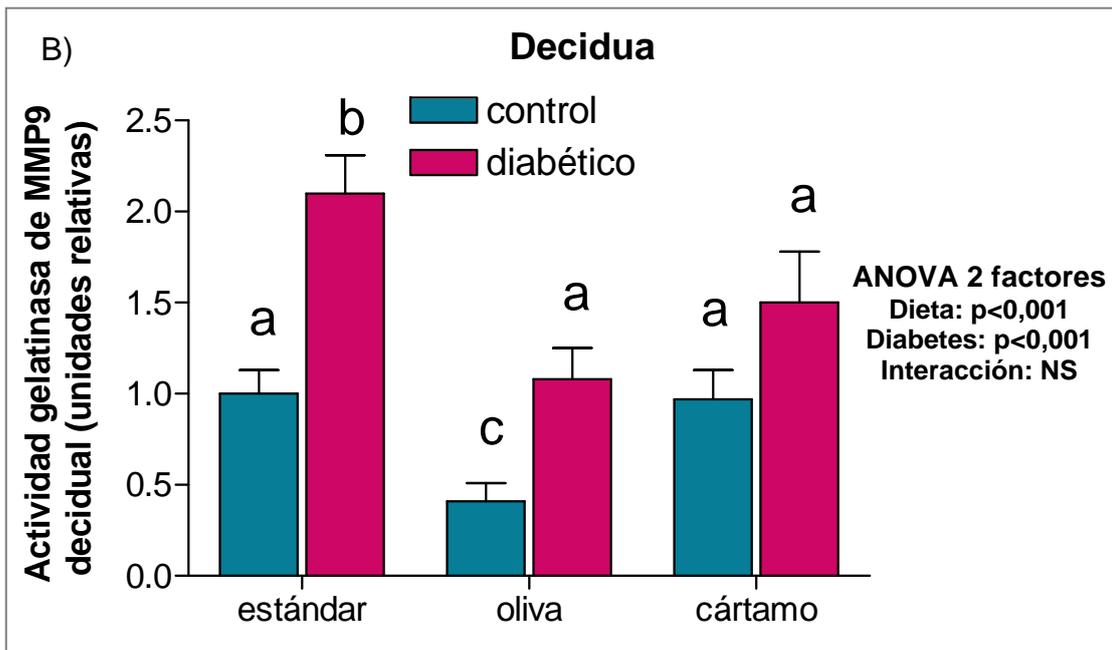
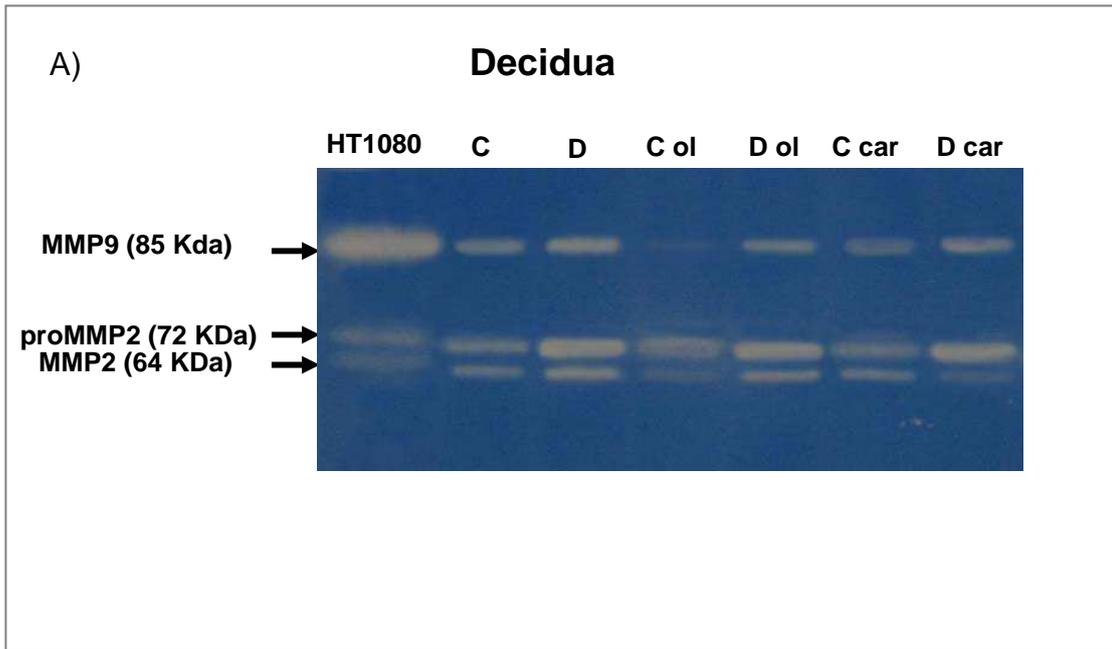
Figura 25. Zimografía representativa (A) que muestra el efecto de la suplementación dietaria con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la actividad de la MMP9 (B), proMMP2 (C) y MMP2 (D) en embrión de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto al tejido decidual, en la Figura 26 A se observa una zimografía representativa que muestra las bandas correspondientes a la actividad gelatinolítica de la MMP9, proMMP2 y MMP2 del medio condicionado de las células HT1080 y de las deciduas de ratas controles y diabéticas que fueron alimentadas con dieta estándar, enriquecida en aceite de oliva o enriquecida en aceite de cártamo.

Al analizar la actividad de las MMPs en el tejido decidual, observamos que la actividad de la MMP9 disminuye con el tratamiento dietario con el aceite de oliva ($p < 0,01$) en las deciduas de ratas sanas mientras que la suplementación con el aceite de cártamo no modifica la actividad de dicha enzima cuando se la compara con las deciduas de ratas controles alimentadas con dieta estándar (Figura 26 B). Al estudiar la actividad de la MMP9 en las deciduas de ratas diabéticas, observamos que el incremento en la actividad de esta enzima observado en las deciduas de ratas diabéticas alimentadas con dieta estándar en relación al control, se previene tanto con la dieta enriquecida con el aceite de oliva ($p < 0,01$) como con aceite de cártamo ($p < 0,05$) (Figura 26 B).

Respecto a la proMMP2, no observamos modificaciones en la actividad de esta proenzima en las deciduas cuando tratamos las ratas sanas con las dietas enriquecidas en agonistas de PPARs (Figura 26 C). En las deciduas provenientes de ratas diabéticas, observamos que si bien la actividad de la proMMP2 se encuentra incrementada en las deciduas de ratas diabéticas alimentadas con dieta estándar, ninguno de los tratamientos dietarios ejerce efecto sobre la actividad de esta proenzima (Figura 26 C).

La actividad de la MMP2 es similar en las deciduas de ratas controles y diabéticas alimentadas con la dieta estándar y en ninguno de los casos varía con la suplementación dietaria de aceite de oliva o de aceite de cártamo (Figura 26 D).



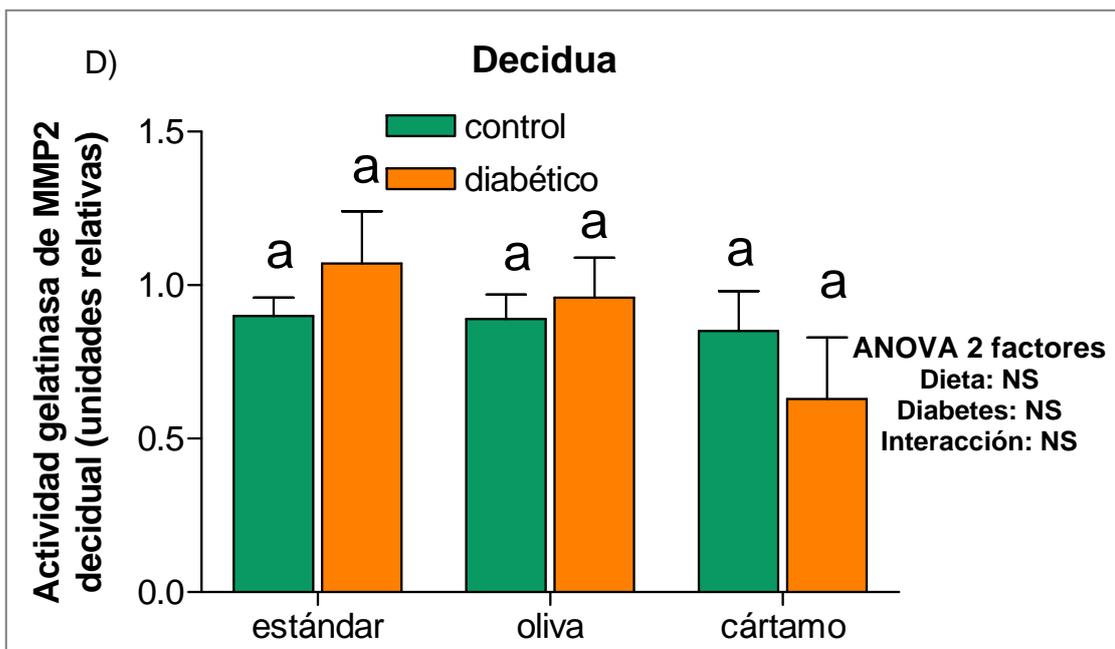
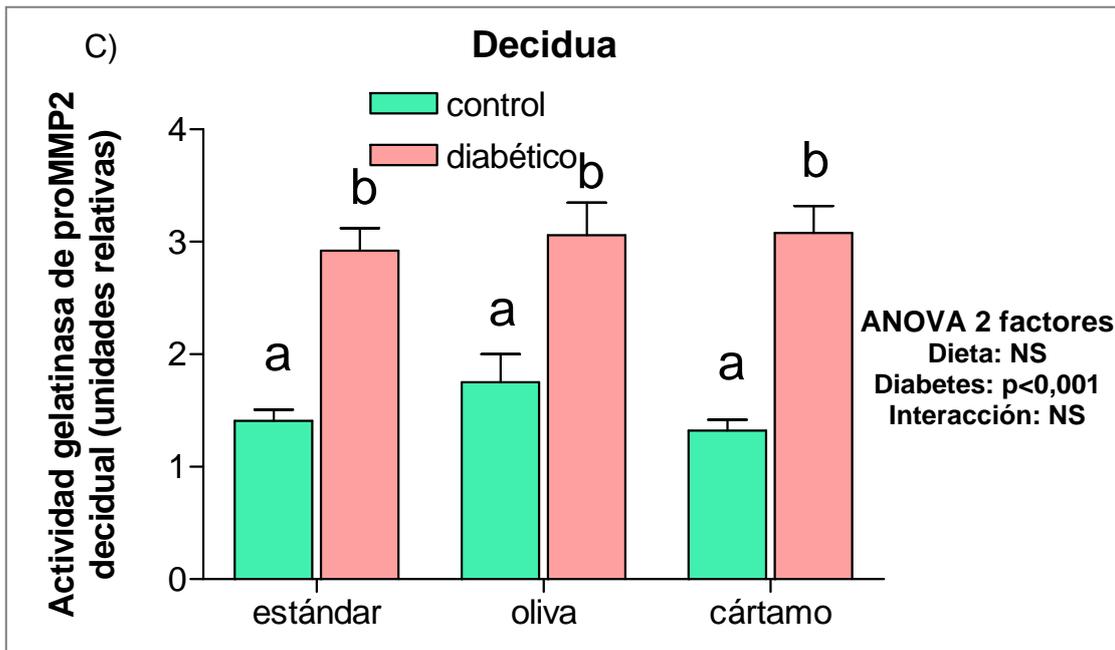


Figura 26. Zimografía representativa (A) que muestra el efecto de la suplementación dietaria con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la actividad de la MMP9 (B), proMMP2 (C) y MMP2 (D) en decidua de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Actividad de los inhibidores tisulares de las MMPs en el embrión y la decidua de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

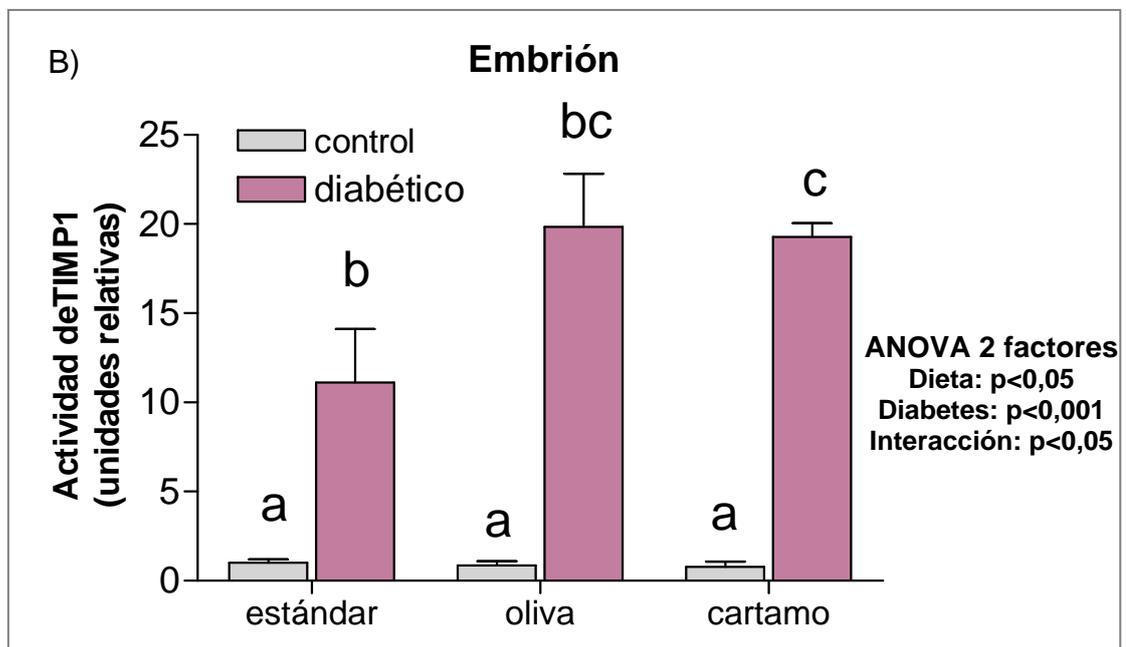
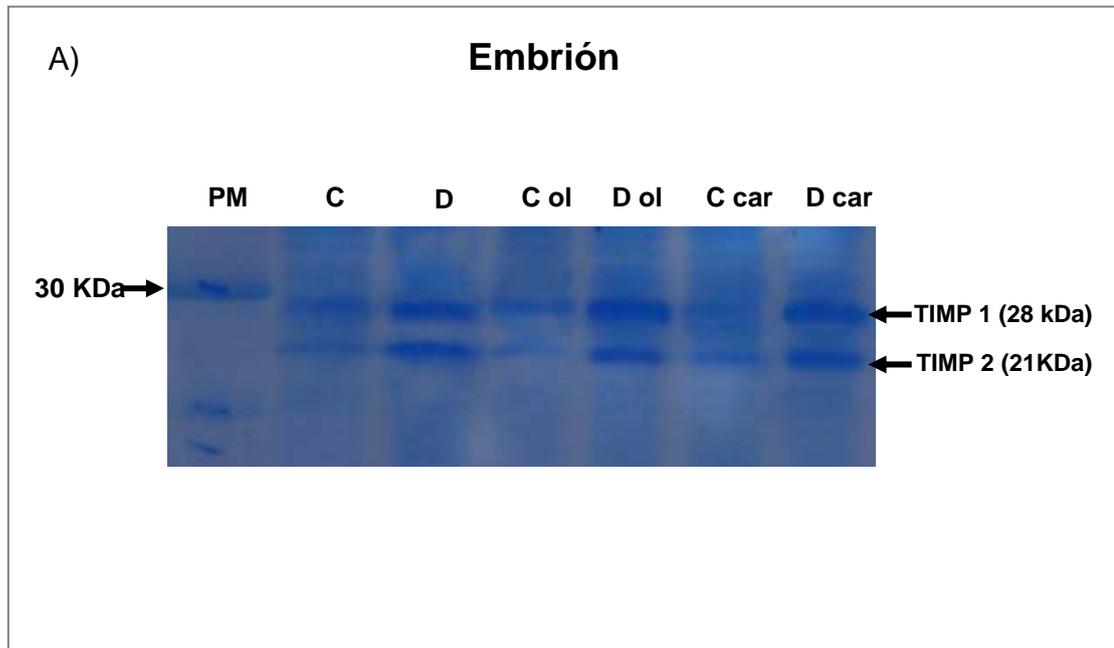
Considerando que los TIMPs son inhibidores endógenos de las MMPs, que tanto a través de dicha inhibición como también en forma independiente de la misma poseen funciones relevantes en la embriogénesis (Brenner y col. 1989; Lambert y col. 2004) y que encontramos variaciones en la actividad de los TIMPs en embriones y deciduas de ratas diabéticas, continuamos los estudios evaluando en el día 10,5 de gestación la inhibición de la actividad de las MMPs por TIMPs en embriones y deciduas de ratas sanas y diabéticas a las cuales se les administró desde el día 0,5 al 10,5 de gestación tratamientos dietarios consistentes en: a) dieta estándar o control, b) dieta estándar suplementada con 6% de aceite de oliva y c) dieta estándar suplementada con 6 % de aceite de cártamo.

En una zimografía reversa representativa (Figura 27 A) podemos observar las bandas correspondientes a la actividad de TIMP1 y de TIMP2 en embriones de ratas sanas y diabéticas que fueron sometidas a los tratamientos dietarios con alimento estándar, suplementado con aceite de oliva o aceite de cártamo.

Se observó que la actividad de TIMP1 no se modifica con la administración de los tratamientos dietarios con agonistas de PPARs en embriones provenientes de ratas sanas. En los embriones de ratas diabéticas alimentadas con la dieta estándar, donde se evidencia un incremento en la actividad de TIMP1, si bien la dieta suplementada con aceite de oliva no modificó la actividad de esta proteína, la dieta enriquecida en aceite de cártamo fue capaz de aumentar aún más los niveles de TIMP1 ($p < 0,05$) (Figura 27 B).

Respecto a TIMP2, observamos que la actividad de esta proteína en los embriones de ratas sanas no se modificó al tratar a los animales con las dietas suplementadas con aceite de oliva y cártamo (Figura 27 C). La actividad de TIMP2 que es mayor en los embriones de ratas diabéticas alimentadas con dieta estándar respecto a los embriones de ratas controles, no se vio modificada por el tratamiento dietario consistente en la suplementación con el aceite de oliva aunque se observó un incremento en

su actividad con la suplementación con el aceite de cártamo ($p < 0,05$) (Figura 27 C).



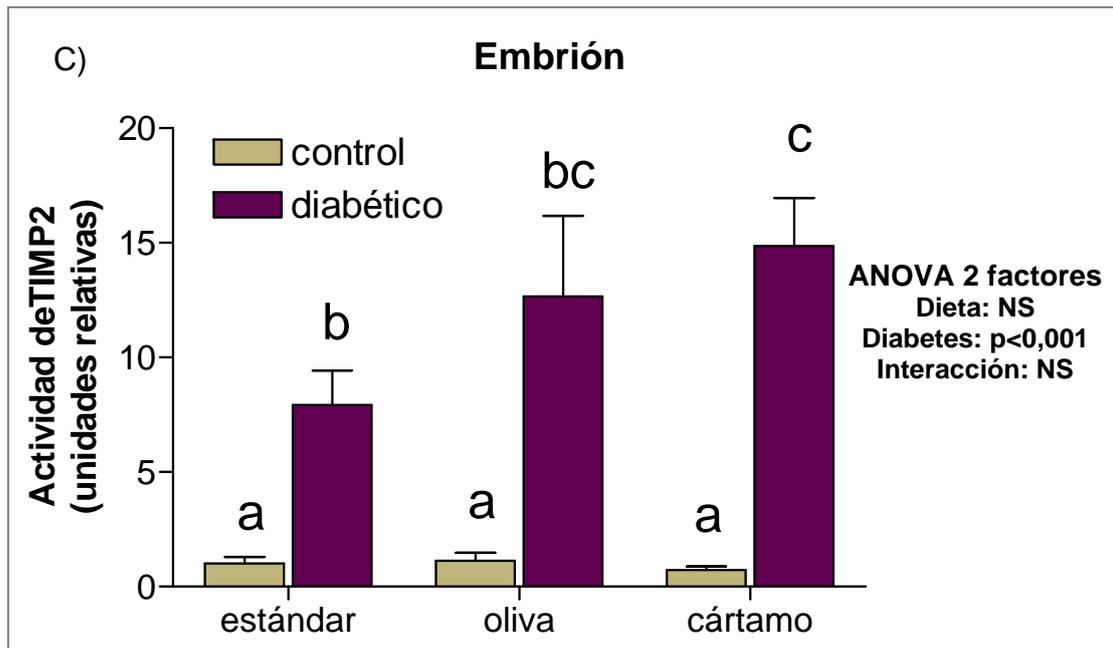
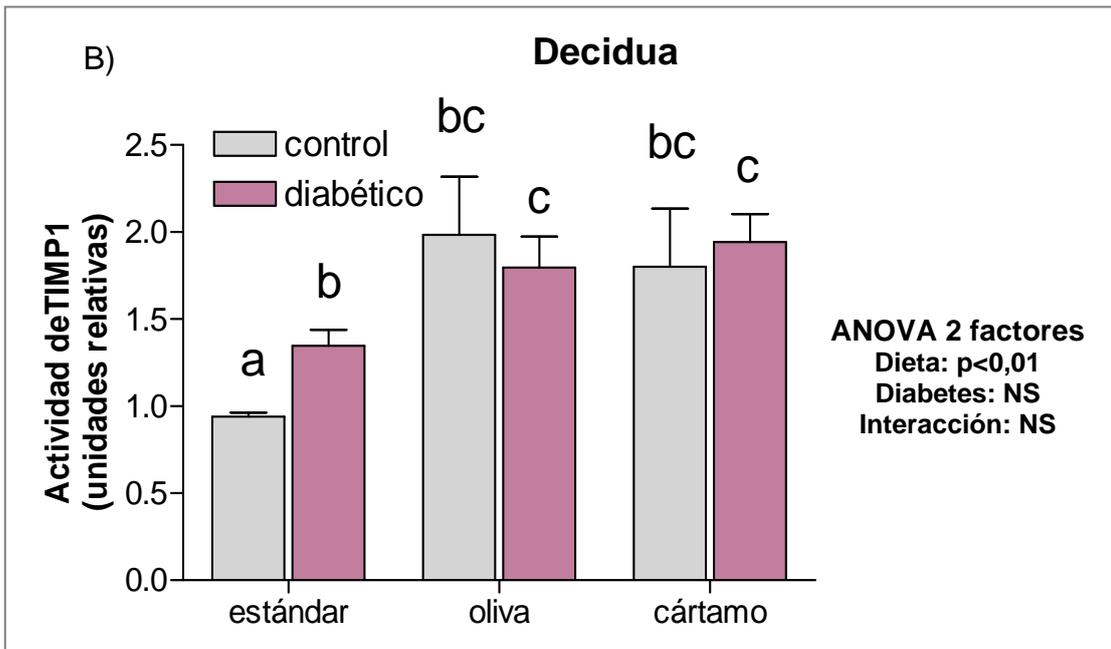
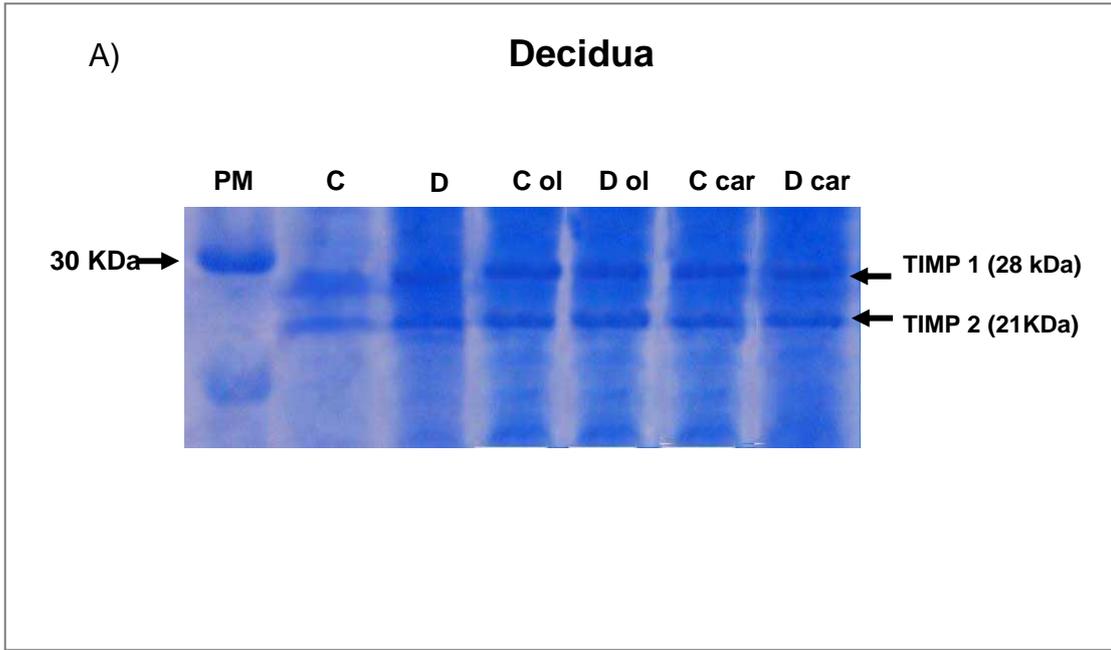


Figura 28. Zimografía reversa representativa (A) que muestra el efecto de la suplementación dietaria con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la actividad inhibitoria de TIMP1 (A) y de TIMP2 (B) en el embrión de ratas sanas y diabéticas en periodo de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la decidua, observamos en la Figura 28 A una zimografía representativa que muestra las bandas correspondientes a la actividad de TIMP1 y de TIMP2 en tejido decidual proveniente de rata sana y diabética que fueron alimentadas con dieta estándar o ricas en aceite de oliva o aceite de cártamo.

Al analizar el tejido decidual de rata sana, observamos un incremento de la actividad de TIMP1 al tratar a los animales tanto con la dieta suplementada con aceite de oliva ($p < 0,01$) como con la suplementada con aceite de cártamo ($p < 0,01$) (Figura 28 B). En las deciduas provenientes de ratas diabéticas alimentadas con dieta estándar, donde se evidencia un incremento en la actividad de TIMP1 en relación al control alimentado con dieta estándar, la actividad de dicho TIMP se vio incrementada aún más con la administración de la dieta suplementada con aceite de oliva ($p < 0,05$) y también con la suplementada con aceite de cártamo ($p < 0,01$) (Figura 28 B).



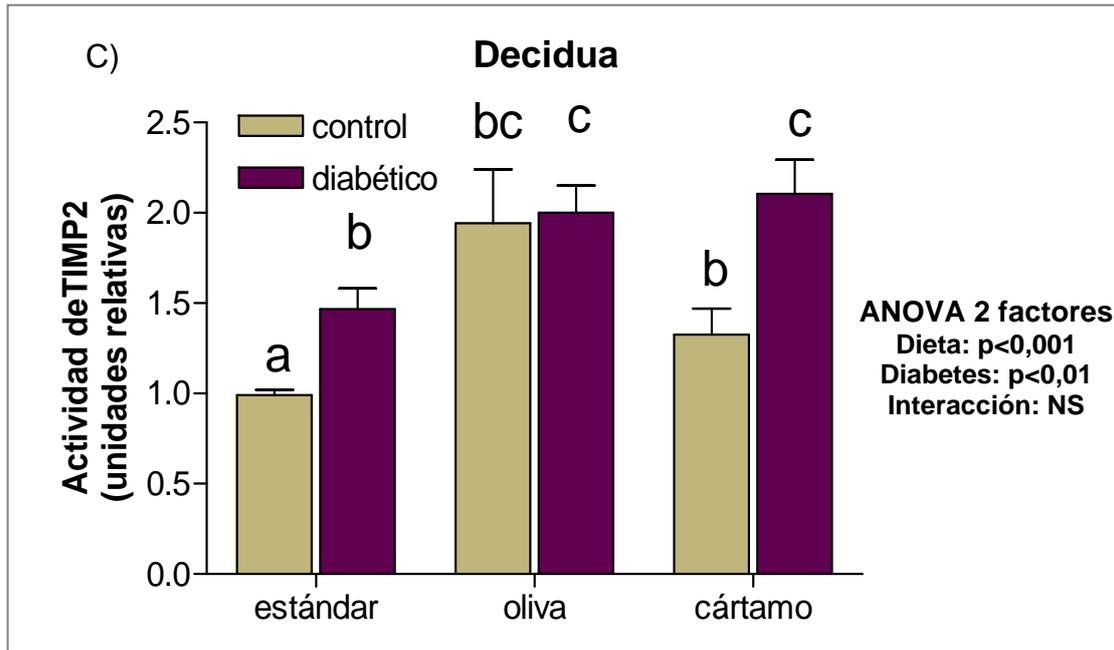


Figura 28. Zimografía reversa representativa (A) que muestra el efecto de la suplementación dietaria con 6% de aceite de oliva o 6% de aceite de cártamo sobre la actividad inhibitoria de TIMP1 (A) y de TIMP2 (B) en la decidua de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p<0,05$).

Al estudiar la actividad de TIMP2, observamos que la misma se vio incrementada en las deciduas de ratas sanas con los tratamientos dietarios consistentes en la suplementación con el aceite de oliva ($p<0,001$) y el aceite de cártamo ($p<0,05$) (Figura 28 C). En las deciduas de ratas diabéticas alimentadas con la dieta estándar, donde es mayor la actividad de TIMP2 en relación al control alimentado con dieta estándar, los tratamientos que consisten en la suplementación dietaria con el aceite de oliva y el aceite de cártamo incrementan aún más la actividad de este inhibidor de MMPs ($p<0,05$) (Figura 28 C).

Capítulo III

Efecto del tratamiento *in vivo* con ácido fólico y agonistas de PPARs a ratas controles y diabéticas gestantes sobre el embrión y la decidua en el período de organogénesis temprana

Considerando nuestros hallazgos que muestran resultados benéficos de la suplementación dietaria con agonistas de PPARs aunque sin una completa reversión de las alteraciones inducidas por la diabetes materna en el embrión y la decidua, y sabiendo que la ingesta de ácido fólico se prescribe durante el período periconcepcional a fin de prevenir la dismorfogénesis embrionaria y que se recomiendan dosis aún mayores para las gestantes diabéticas si bien no está clarificado aún su mecanismo de acción, fue de interés estudiar el efecto de la administración de ácido fólico a ratas sanas y diabéticas gestantes, como así también su administración conjunta con el tratamiento dietario enriquecido en aceite de cártamo.

Se estudió el efecto de la administración de 20 mg/Kg de ácido fólico y su administración conjunta con la suplementación de la dieta estándar con 6% de aceite de cártamo a ratas sanas y diabéticas desde el día 0,5 al 10,5 de gestación.

Glucemia, parámetros de crecimiento embrionario y tasa de reabsorción y malformación embrionaria en ratas sanas y diabéticas en etapa de organogénesis temprana

Desde el día 0,5 al 10,5 de gestación, los animales sanos y diabéticos fueron sometidos a los siguientes tratamientos: a) dieta estándar o control, b) dieta estándar y administración diaria subcutánea de 20 mg/Kg de ácido

fólico y c) administración diaria subcutánea de 20 mg/Kg de ácido fólico junto a una dieta estándar suplementada con 6 % de aceite de cártamo para luego estudiar la glucemia materna, parámetros de crecimiento y desarrollo embrionario y la tasa de reabsorción y malformación embrionaria.

Pudimos observar que tanto la glucemia materna de las ratas controles como la de las ratas diabéticas permanece inalterada con la administración de los tratamientos de ácido fólico y la aplicación subcutánea de ácido fólico junto a la suplementación dietaria con aceite de cártamo y (Tabla V).

Respecto al crecimiento embrionario, se observó que los tratamientos consistentes en la aplicación de ácido fólico y su aplicación conjunta con la administración de un dieta estándar suplementada con aceite de cártamo, no modificaron los valores del contenido proteico embrionario ni en las ratas sanas ni en las ratas diabéticas (Tabla V).

	Dieta estándar		Dieta estándar y administración de ácido fólico		Dieta estándar supl. con 6% de ac. de cártamo y administración de ácido fólico		ANOVA 2X2
	Control	Diabético	Control	Diabético	Control	Diabético	
Glucemia materna (mg/dl)	105±15 ^a	439±27 ^b	99±28 ^a	379±18 ^b	97±36 ^a	438±33 ^b	Tratamiento : NS Diabetes: p<0,001 Interacción: NS
Contenido proteico embrionario (µg)	58±2,9 ^a	29±1,0 ^b	56±4,0 ^a	30±1,7 ^b	55±3,7 ^a	29±1,5 ^b	Tratamiento : NS Diabetes: p<0,001 Interacción: NS
Número de somitas por embrión	12±0,2 ^a	10±0,1 ^b	12±0,2 ^a	12±0,2 ^a	13±0,2 ^c	12±0,2 ^a	Tratamiento: p<0,001 Diabetes: p<0,001 Interacción: p<0,001

Tabla V. Efecto de la administración de 20 mg/Kg de ácido fólico solo o en conjunto con la suplementación dietaria con 6% de aceite de cártamo sobre la glucemia materna y parámetros de crecimiento y desarrollo embrionario de ratas sanas y diabéticas durante el período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio ± error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 14 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas (p<0,05).

En los embriones provenientes de ratas sanas, el número de somitas, índice de desarrollo embrionario no se modificó con el tratamiento diario de folato, si bien se incrementó con el tratamiento consistente en el suplemento dietario con aceite de cártamo junto a la aplicación de ácido fólico ($p < 0,001$) (Tabla V). En los embriones de rata diabética tratadas con dieta estándar, donde el número de somitas por embrión se encontró disminuido respecto a los embriones de ratas sanas, se observó un incremento en este índice de desarrollo embrionario tanto con el tratamiento *in vivo* con folato solo ($p < 0,001$) como en conjunto con la suplementación dietaria con aceite de cártamo ($p < 0,001$) (Tabla V).

Al evaluar la tasa de reabsorciones embrionarias, se observó que este parámetro no se modificó en las ratas sanas ni con el tratamiento con folato solo ni con el tratamiento conjunto de folato con la dieta enriquecida en aceite de cártamo (Tabla VI). En cambio, en las ratas diabéticas tratadas con la dieta estándar donde el número de reabsorciones embrionarias se encuentra significativamente incrementado respecto al control, tanto el tratamiento con ácido fólico solo como su administración conjunta con la dieta enriquecida con aceite de cártamo, reducen ampliamente dicho parámetro ($p < 0,001$) (Tabla VI).

Respecto a las malformaciones embrionarias, en los embriones de ratas sanas, esta tasa no se modifica con los tratamientos con ácido fólico o con ácido fólico junto a la administración de una dieta rica en aceite de cártamo. En cambio, en los embriones provenientes de ratas diabéticas, donde se evidenció un incremento en la tasa de malformaciones embrionarias respecto al control, pudimos observar una disminución de las malformaciones embrionarias con el tratamiento diario con ácido fólico ($p < 0,05$) y con el tratamiento con folato junto a la administración de la dieta rica en aceite de cártamo, obteniendo en este último caso, valores de tasa de malformación embrionaria similares a los observados en los embriones de ratas sanas ($p < 0,01$) (Tabla VI).

	Dieta estándar		Dieta estándar y administración de ácido fólico		Dieta estándar supl. con 6% de ac. de cártamo y administración de ácido fólico		Chi cuadrado
	Control	Diabético	Control	Diabético	Control	Diabético	
Número de reabsorciones (%)	10/173 ^a (5,8%)	85/255 ^b (33,3%)	5/131 ^a (3,8%)	6/118 ^a (5,1%)	4/112 ^a (3,6%)	6/88 ^a (6,8%)	p<0,001
Número de malformaciones (%)	2/163 ^a (1,2%)	26/170 ^b (15,3%)	1/126 ^a (0,8%)	7/112 ^c (6,2%)	1/108 ^{ac} (0,9%)	2/82 ^{ac} (2,4%)	p<0,001

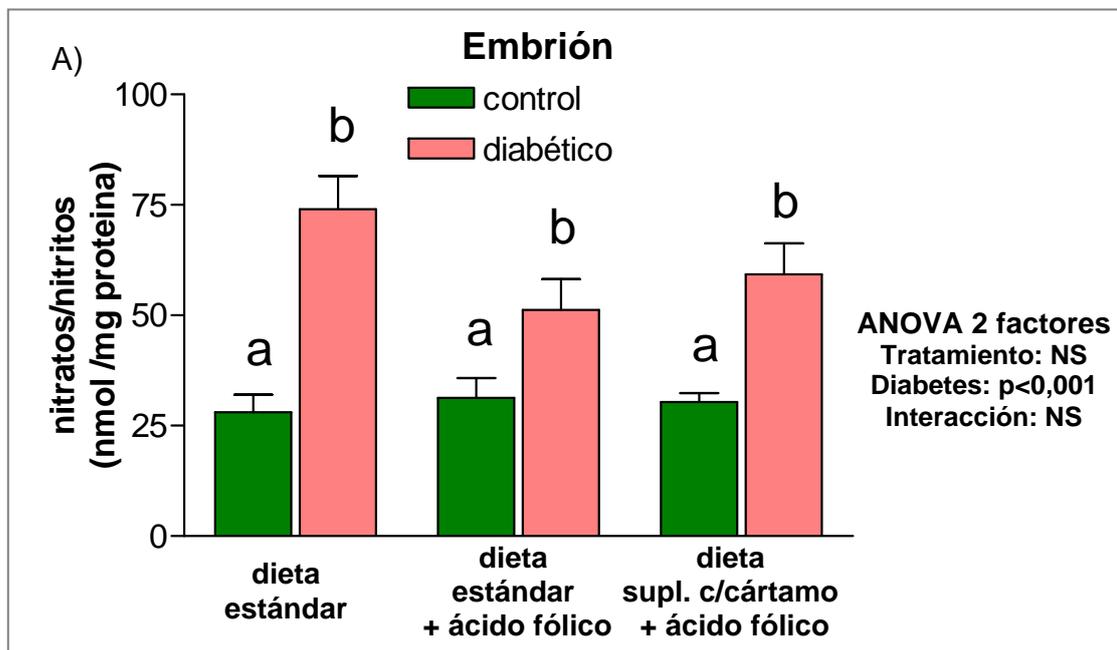
Tabla VI. Efecto de la administración de 20 mg/Kg de ácido fólico solo o en conjunto con la suplementación dietaria con 6% de aceite de cártamo sobre la tasa de reabsorción y de malformación embrionaria en ratas sanas y diabéticas durante el período de organogénesis temprana. Los datos de número de reabsorciones expresan el número de reabsorciones / total de sitios de implantación y los datos de número de malformaciones expresan el número de embriones malformados / total de embriones viables. Test estadístico: chi cuadrado. Diferentes letras expresan diferencias significativas (p<0,05).

Producción de óxido nítrico en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

Considerando que el ácido fólico tiene la capacidad de regular los niveles NO en el sistema vascular (Stroes y col. 2000) y dada la anormal producción de NO que presentan los embriones y las deciduas de rata diabética durante la organogénesis temprana, se evaluó en el día 10,5 de gestación los niveles de nitratos/nitritos, índice de la producción de óxido nítrico, en el embrión y la decidua de ratas controles y diabéticas sometidas desde el día 0,5 al 10,5 de gestación con los siguientes tratamientos: a) dieta estándar o control, b) administración diaria subcutánea de 20 mg/Kg de ácido fólico y c) administración diaria subcutánea de 20 mg/Kg de ácido fólico junto a una dieta estándar suplementada con 6 % de aceite de cártamo.

Los niveles de nitratos/nitritos no se modifican ni en los embriones de rata sana ni en los embriones de rata diabética con los tratamientos consistentes en la administración de ácido fólico tanto solo o en conjunto con la suplementación de la dieta con aceite de cártamo (Figura 29 A).

Cuando evaluamos el tejido decidual de las ratas controles observamos que los niveles de nitratos/nitritos permanecen inalterados al tratar *in vivo* a los animales con la aplicación diaria de ácido fólico o con su aplicación realizada en conjunto con la suplementación dietaria con aceite de cártamo (Figura 29 B). En cambio, respecto a los niveles de nitratos/nitritos, incrementados en las deciduas provenientes de ratas diabéticas alimentadas con dieta estándar respecto al control, tanto la administración de ácido fólico solo como en conjunto con la dieta suplementada con aceite de fueron capaces de disminuir dichos niveles a valores similares a los hallados en los embriones de rata sana ($p < 0,05$) (Figura 29 B).



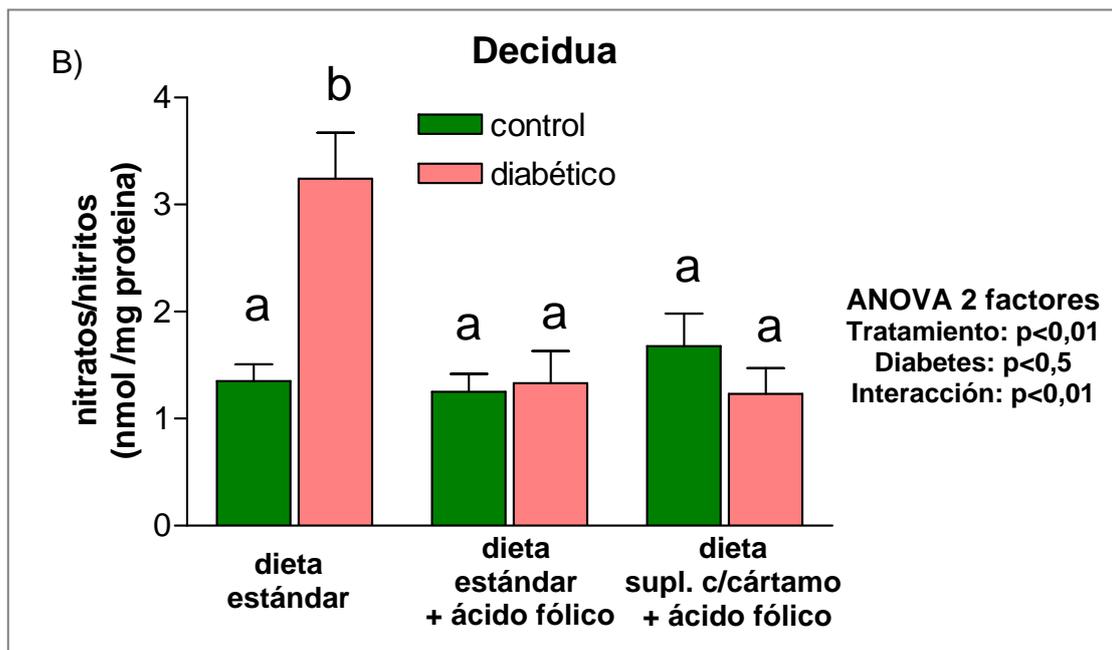
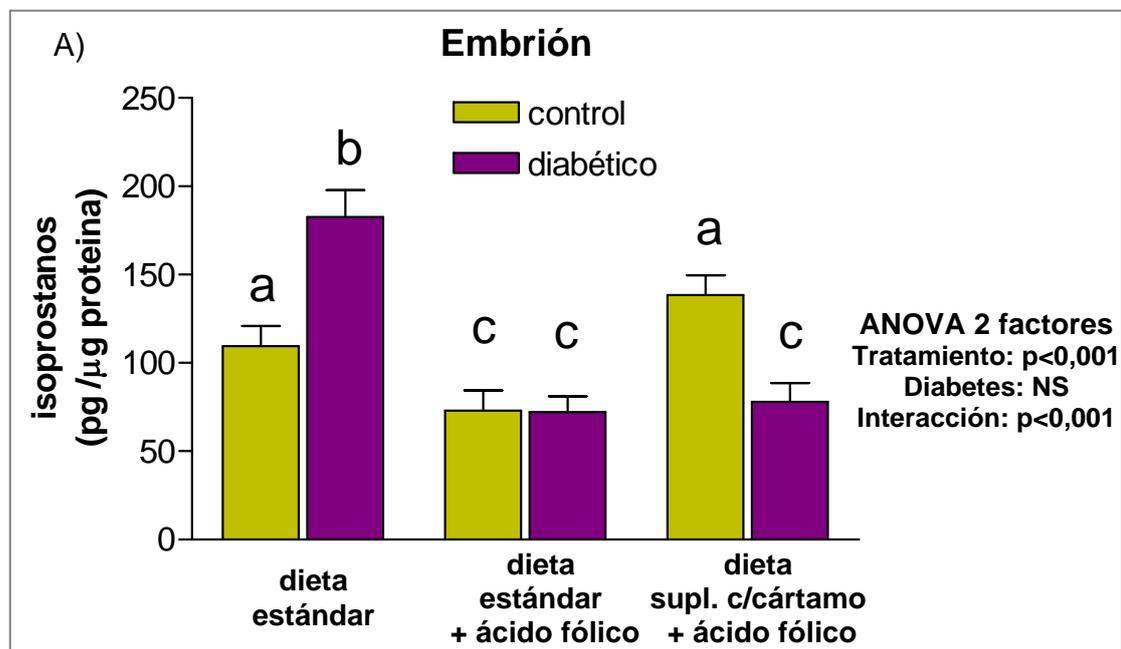


Figura 29. Efecto de la administración de 20 mg/Kg de ácido fólico solo o en conjunto con la suplementación dietaria con 6% de aceite de cártamo sobre los niveles de nitratos/nitritos en el embrión (A) y la decidua (B) de rata sana y diabética en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Niveles de peroxidación lipídica en el embrión y la decidua provenientes de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

Dado que nuestros resultados previos evidenciaron un incremento en la lipoperoxidación lipídica en los embriones y deciduas de ratas diabéticas y conociendo que el ácido fólico es capaz de actuar como antioxidante (Moens y col. 2008), se evaluó en el día 10,5 de gestación los niveles de isoprostanos en el embrión y de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) en la decidua de ratas controles y diabéticas sometidas desde el día 0,5 al 10,5 de gestación a los siguientes tratamientos: a) dieta estándar o control, b) administración diaria subcutánea de 20 mg/Kg de ácido fólico a animales alimentados con dieta estándar y c) administración diaria subcutánea de 20 mg/Kg de ácido fólico junto a una dieta estándar suplementada con 6 % de aceite de cártamo.

Pudimos observar que en los embriones de rata sana, los niveles de isoprostanos, índice de peroxidación lipídica, disminuyen respecto al control al tratar a los animales diariamente con ácido fólico ($p < 0,05$), mientras que los mismos no se modifican cuando se trata a las ratas sanas con ácido fólico en conjunto con una dieta enriquecida en aceite de cártamo (Figura 30 A). En los embriones provenientes de ratas diabéticas que presentan un incremento de los niveles de isoprostanos respecto al control, ambos tratamientos, el consistente en la aplicación de ácido fólico solo y en conjunto con la suplementación dietaria con aceite de cártamo fueron capaces de reducir los niveles de isoprostanos ($p < 0,001$) (Figura 30 A).



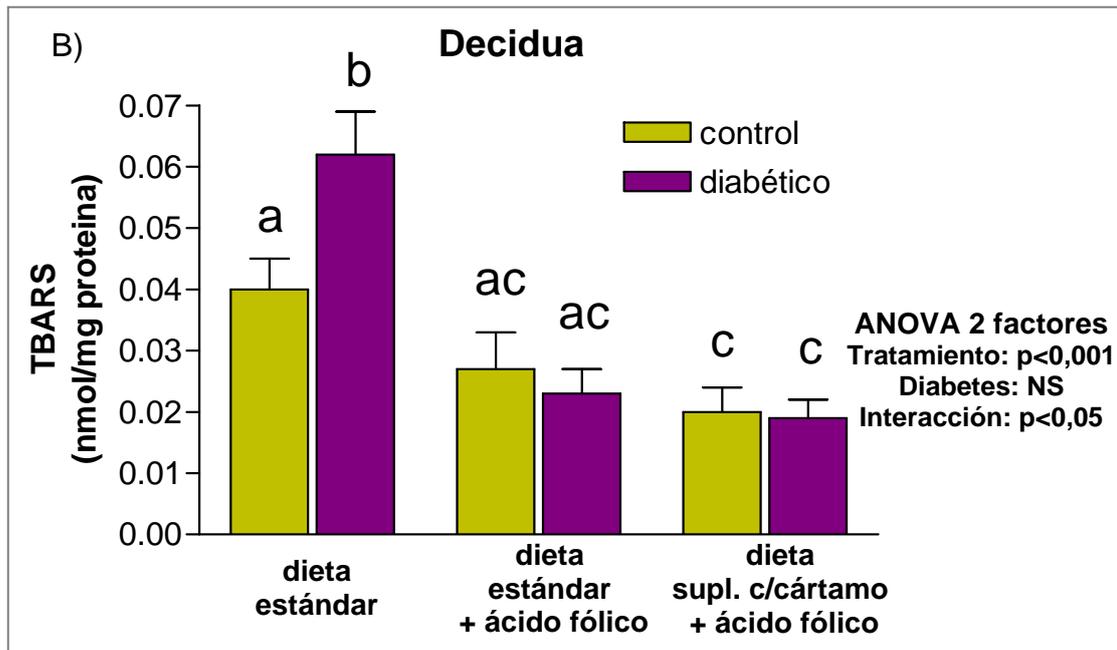


Figura 30, Efecto de la administración de 20 mg/Kg de ácido fólico solo o en conjunto con la suplementación dietaria con 6% de aceite de cártamo sobre los niveles de isoprostanos en el embrión (A) y de TBARS en la decidua (B) de rata sana y diabética en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la peroxidación lipídica en el tejido decidual, observamos que en las ratas sanas el tratamiento con ácido fólico no tiene efecto significativo en los niveles de TBARS mientras que el tratamiento conjunto de ácido fólico con la suplementación dietaria con el aceite de cártamo redujo los niveles de este marcador de peroxidación lipídica ($p < 0,05$) (Figura 30 B). En las deciduas provenientes de ratas diabéticas, donde es importante el incremento de los niveles de TBARS respecto al control, tanto el tratamiento diario con el ácido fólico como la aplicación de ácido fólico en conjunto con la administración de una dieta enriquecida en aceite de cártamo fueron capaces de reducir los niveles de peroxidación lipídica ($p < 0,001$) (Figura 30 B).

Actividad de las metaloproteasas en el embrión y la decidua de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

Dado el incremento observado en la actividad de las MMPs en los embriones y deciduas de ratas diabéticas y dada la capacidad del folato de regular los niveles de NO y especies reactivas del oxígeno, agentes capaces de activar a las MMPs, fue de interés evaluar en el día 10,5 de gestación la actividad de la MMP9 y MMP2 en ratas sanas y diabéticas sometidas desde el día 0,5 al 10,5 de gestación a los siguientes tratamientos: a) dieta estándar o control, b) administración diaria subcutánea de 20 mg/Kg de ácido fólico y c) administración diaria subcutánea de 20 mg/Kg de ácido fólico junto a una dieta estándar suplementada con 6 % de aceite de cártamo.

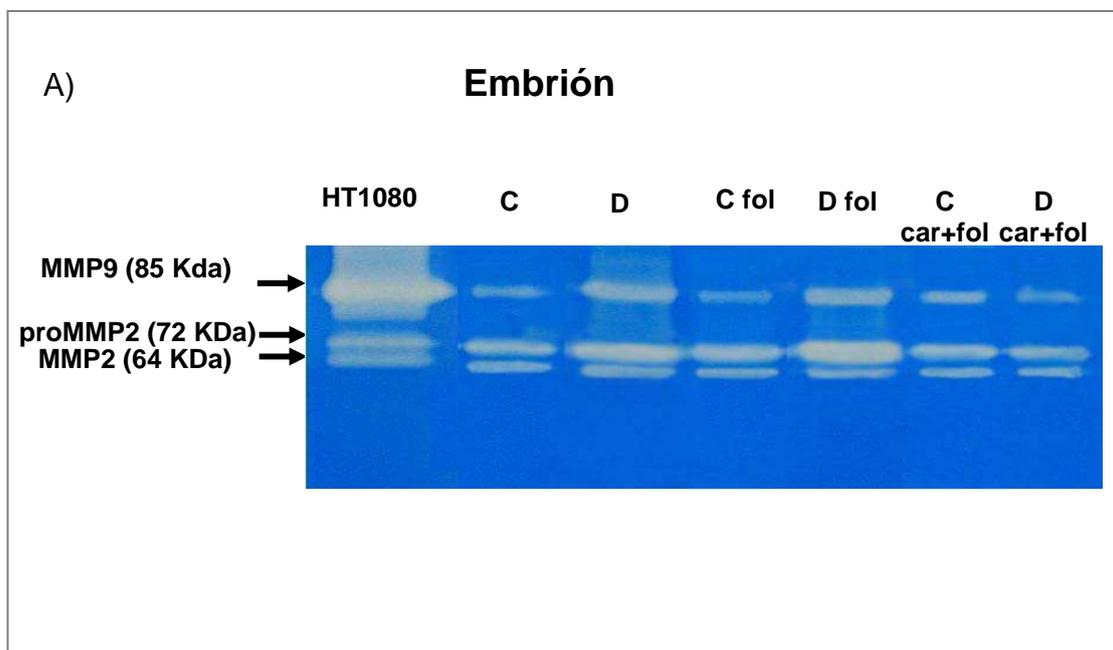
En la Figura 31 A podemos observar una zimografía representativa que muestra las bandas correspondientes a la actividad gelatinolítica de la MMP9, proMMP2 y MMP2 del control positivo, que consistió en medio condicionado de un cultivo de células HT1080, y de embriones provenientes de ratas sanas y diabéticas que fueron tratadas con la administración de ácido fólico o de ácido fólico en conjunto con una dieta suplementada con aceite de cártamo.

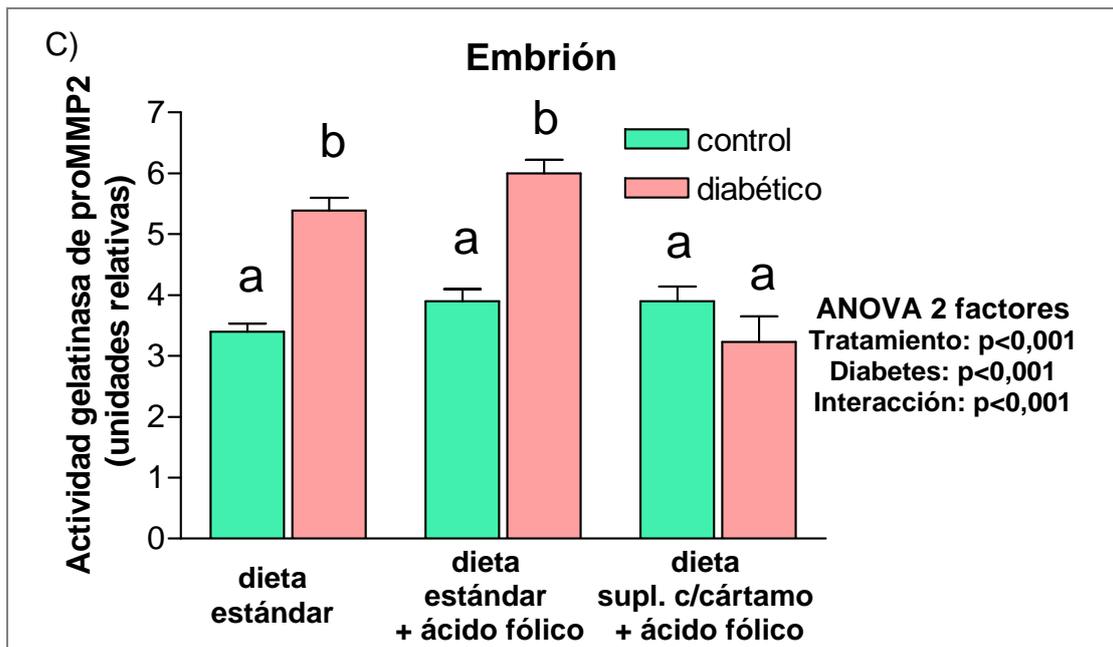
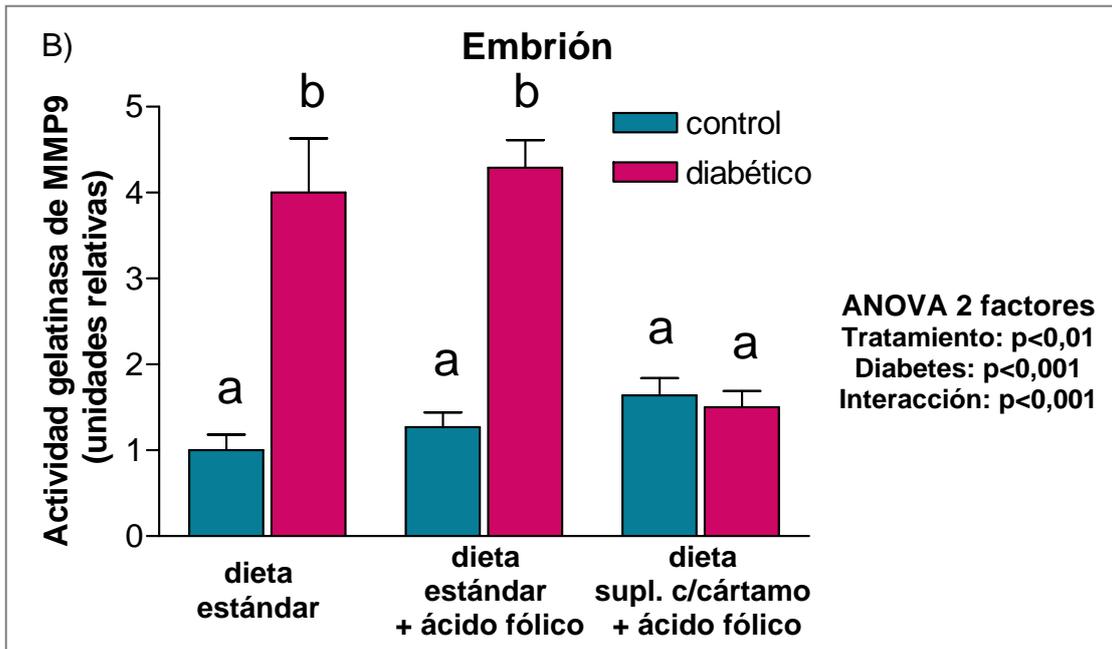
Al evaluar la actividad de la MMP9 en los embriones de ratas controles, pudimos observar que la misma no se modifica al someter a los animales al tratamiento con folato ni al tratamiento conjunto de folato con la suplementación dietaria con aceite de cártamo (Figura 31 B). En los embriones de rata diabética donde la actividad de la MMP9 se encuentra incrementada respecto a la actividad de esta MMP en los embriones de rata sana, el tratamiento con folato no modificó los valores de actividad de esta enzima, mientras que el tratamiento conjunto de folato con la suplementación dietaria con aceite de cártamo fue capaz de disminuir los valores de actividad de esta MMP a valores similares al control ($p < 0,01$) (Figura 31 B).

Cuando estudiamos la actividad de la proMMP2 observamos, de manera similar a la actividad de la MMP9, que en los embriones de rata sana la actividad de esta proenzima no se modificó con ninguno de los tratamientos consistentes en la administración de ácido fólico o de ácido

fólico en conjunto con una dieta rica en aceite de cártamo (Figura 31 C). En los embriones de rata diabética, donde la actividad de la proMMP2 está aumentada respecto al control, no se observó efecto con el tratamiento con folato pero sí se evidenció una reducción de la actividad de la forma latente de la MMP2 con el tratamiento conjunto de ácido fólico con la suplementación dietaria con el aceite de cártamo ($p < 0,001$) (Figura 31 C).

Respecto a la actividad de la MMP2, obtuvimos resultados similares a lo observado para la MMP9 y proMMP2; en los embriones de rata sana no se observaron modificaciones en la actividad de esta enzima con los tratamientos con ácido fólico y con ácido fólico junto a la dieta rica en aceite de cártamo (Figura 31 D). La actividad de la MMP2 en los embriones de rata diabética, incrementada respecto a la actividad de esta enzima en los embriones de rata sana, no se modificó con el tratamiento con folato mientras que la administración de ácido fólico en conjunto con la dieta suplementada con aceite de cártamo logró disminuir la actividad de la MMP2 en los embriones de rata diabética ($p < 0,05$) (Figura 31 D).





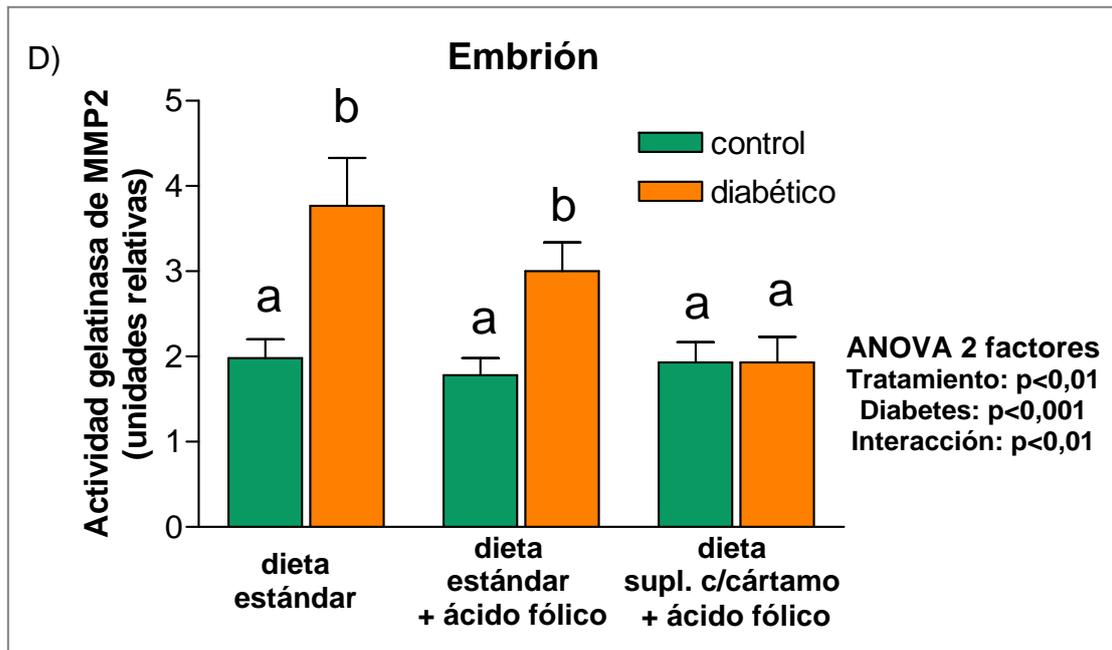


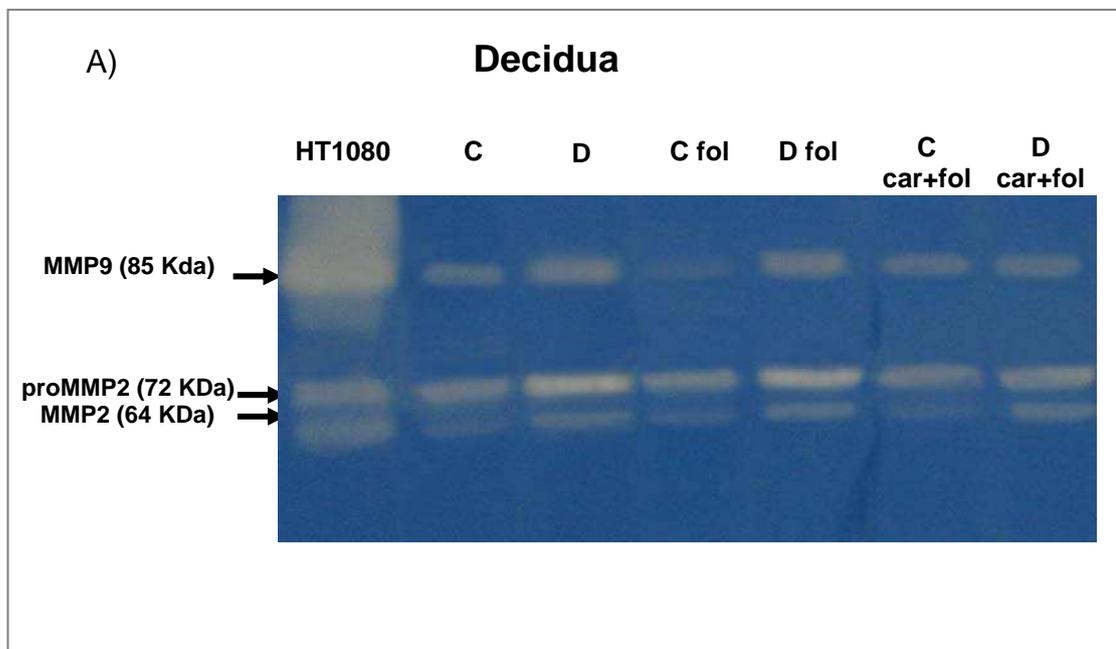
Figura 31. Zimografía representativa (A) que muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg de ácido fólico solo o en conjunto con la suplementación dietaria con 6% de aceite de cártamo sobre la actividad de la MMP9 (B), proMMP2 (C) y MMP2 (D) en los embriones de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

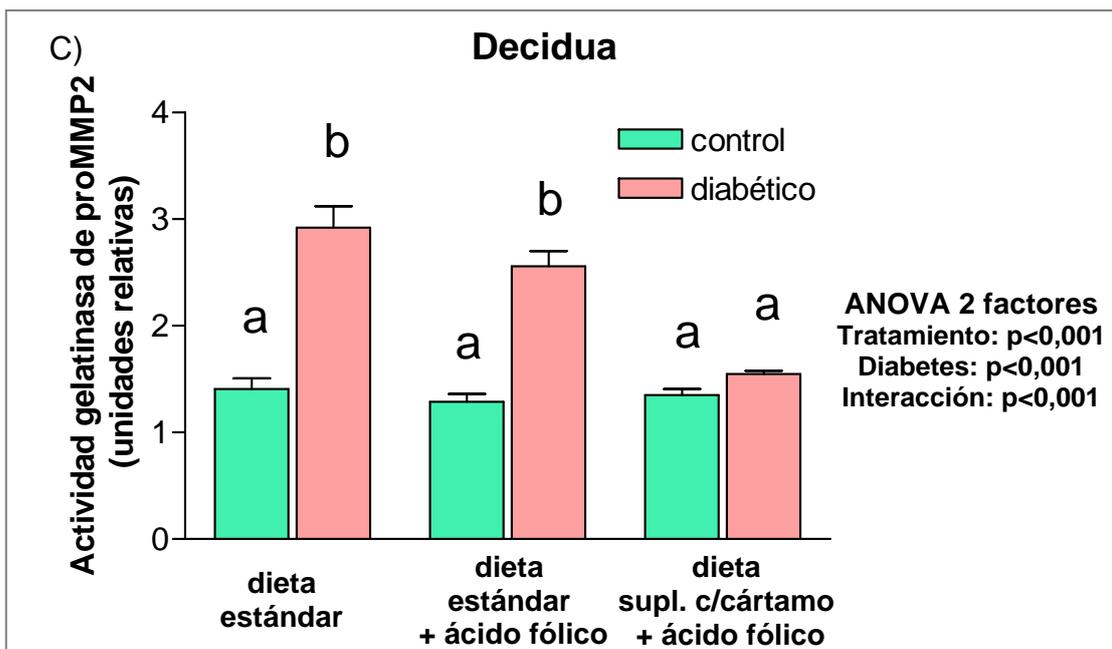
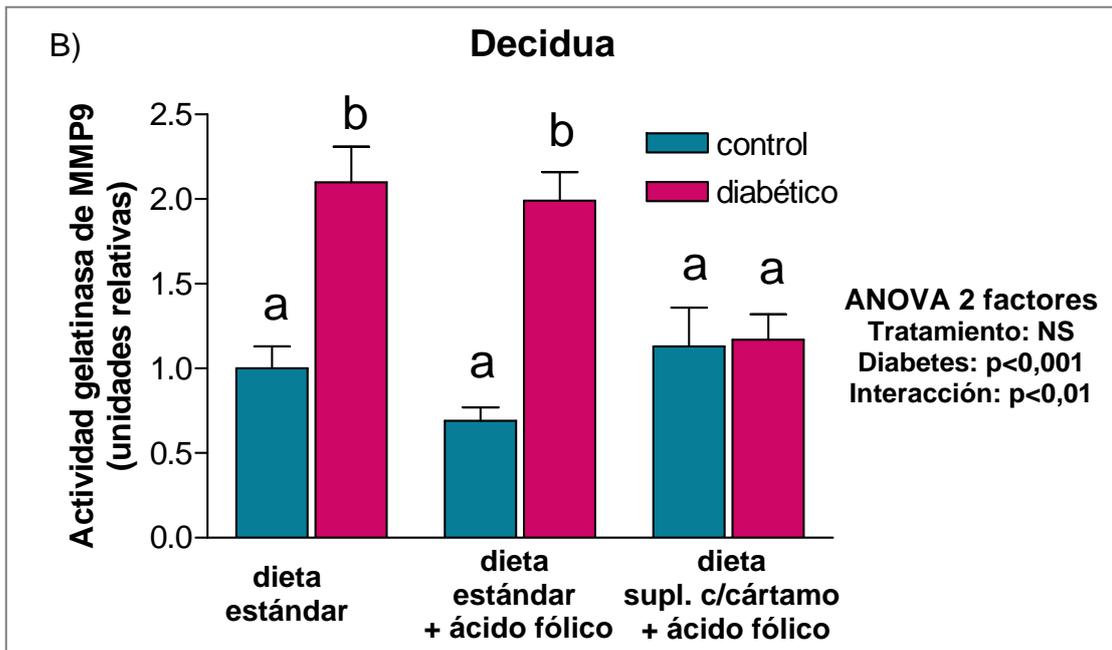
En cuanto al análisis de las gelatinasa a nivel decidual, en la Figura 32 A se observa un zimograma representativo que muestra las bandas que corresponden a la actividad gelatinolítica de la MMP9, proMMP2 y MMP2 y del medio condicionado de células HT1080 (control positivo) en el tejido decidual de ratas sanas y diabéticas que fueron tratadas con aplicación de ácido fólico o ácido fólico junto a la administración de una dieta rica en aceite de cártamo.

Al estudiar la actividad de estas MMPs en el tejido decidual, observamos que la actividad de la MMP9 permanece inalterada en la decidua de rata sana tanto al tratar a los animales con la administración de ácido fólico como con el tratamiento de folato junto a la dieta suplementada con el aceite de cártamo (Figura 32 A). En las deciduas provenientes de ratas diabéticas, donde la actividad de la MMP9 está incrementada respecto a las deciduas de ratas sanas, la actividad de dicha enzima no se vio modificada con el tratamiento consistente en la administración de ácido fólico, sin embargo, se observó una disminución en la actividad de la MMP9

decidual cuando se sometió a las ratas al tratamiento conjunto de folato y la dieta enriquecida en aceite de cártamo ($p < 0,01$) (Figura 32 B).

Cuando evaluamos la actividad de la proMMP2, observamos un comportamiento similar a la actividad de la MMP9, sin observar efecto ni del tratamiento *in vivo* con ácido fólico solo o en conjunto con el aceite de cártamo sobre la actividad de la proMMP2 en las deciduas de ratas sanas. En las deciduas de ratas diabéticas, donde la actividad de la proMMP2 está incrementada, se observó que si bien la administración de ácido fólico no modificó la actividad de esta proenzima, el tratamiento conjunto de ácido fólico con la suplementación dietaria con el aceite de cártamo fue capaz de disminuir la actividad de esta proenzima ($p < 0,001$) (Figura 32 C).





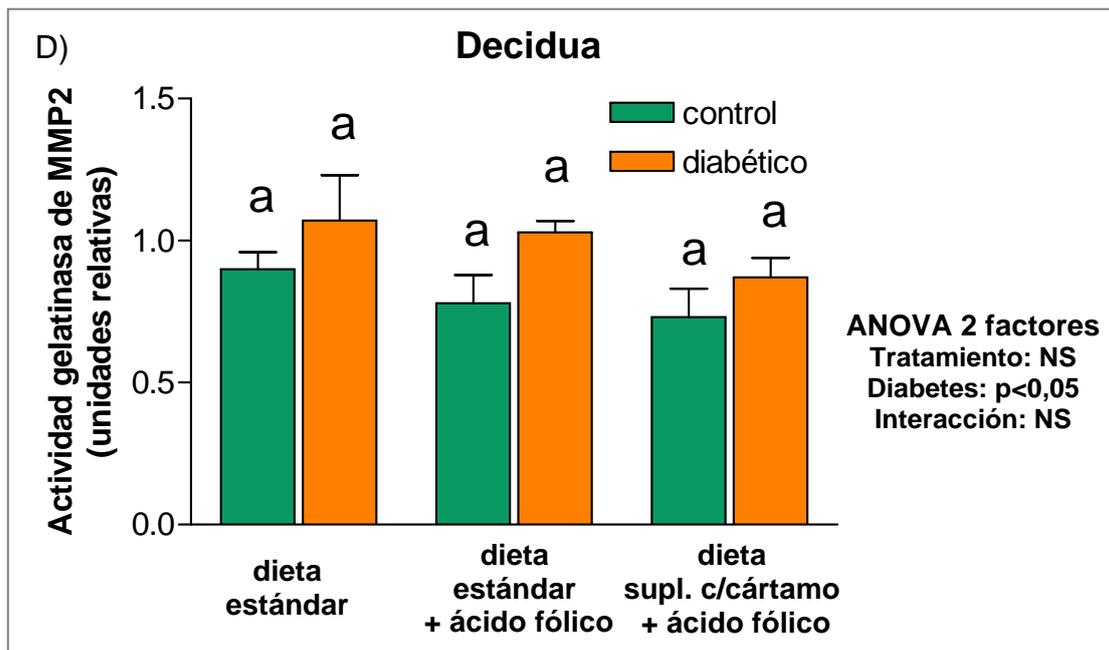


Figura 32. Zimografía representativa (A) que muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg de ácido fólico solo o en conjunto con la suplementación dietaria con 6% de aceite de cártamo sobre la actividad de la MMP9 (B), proMMP2 (C) y MMP2 (D) en la decidua de ratas sanas y diabéticas en período de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

En cuanto a la MMP2, en las deciduas provenientes de ratas sanas y diabéticas, la actividad de esta metaloproteínasa no se vio modificada ni con la administración de ácido fólico ni con el tratamiento que consiste en suplementar la dieta de los animales con aceite cártamo junto a la aplicación diaria de ácido fólico (Figura 32 D).

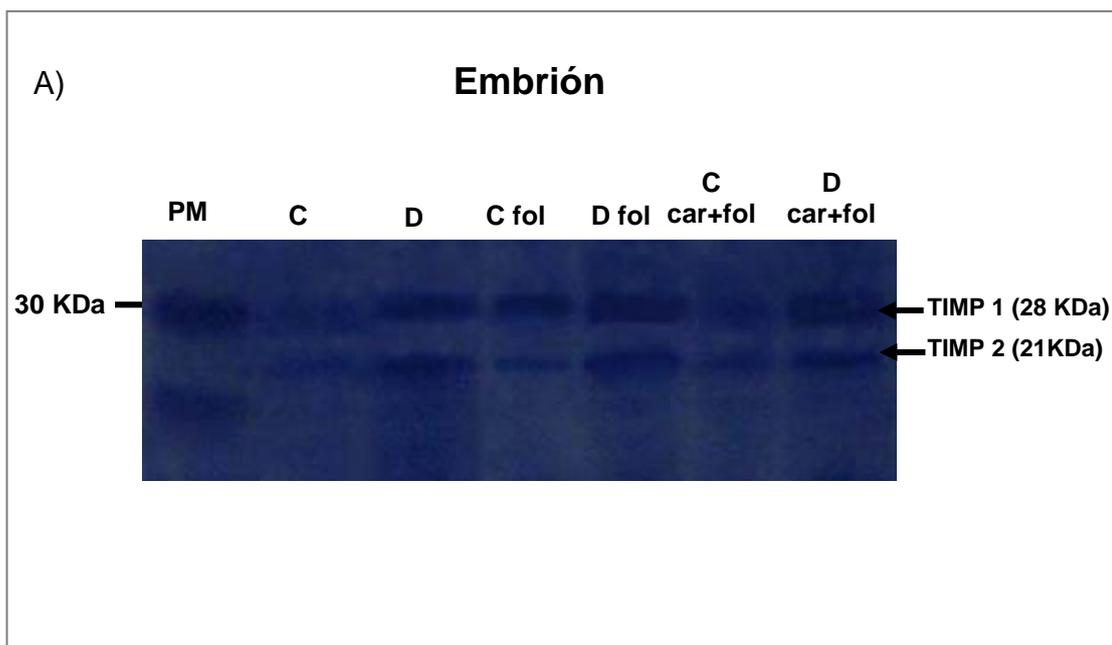
Actividad de los inhibidores tisulares de las MMPs en el embrión y la decidua de ratas controles y diabéticas en período de organogénesis temprana

Siendo necesaria la existencia de un adecuado balance entre las MMPs y sus inhibidores endógenos, los TIMPs, para un normal desarrollo embrionario, y dado que dicho balance se encontró alterado en los

embriones y las deciduas de rata diabética, se evaluó en el día 10,5 de gestación la actividad de los TIMPs en embriones y deciduas de ratas sanas y diabéticas a las cuales se les administró desde el día 0,5 al 10,5 de gestación tratamientos consistentes en: a) dieta estándar o control, b) administración diaria subcutánea de 20 mg/Kg de ácido fólico y c) administración diaria subcutánea de 20 mg/Kg de ácido fólico en conjunto con la dieta estándar suplementada con 6 % de aceite de cártamo.

En la Figura 33 A se observa una zimografía reversa representativa que muestra las bandas correspondientes a la actividad de TIMP1 y de TIMP2 en los embriones provenientes de ratas sanas y diabéticas tratadas con ácido fólico o con ácido fólico junto a una dieta rica en aceite de cártamo.

Pudimos observar que en los embriones de ratas sanas la actividad de TIMP1 se incrementó cuando se las sometió al tratamiento con ácido fólico y también se observó un incremento en la actividad de TIMP1 al tratar a las ratas con ácido fólico junto a la dieta suplementada con el aceite de cártamo ($p < 0,05$) (Figura 33 B). En los embriones de ratas diabéticas, donde existe un importante incremento de la actividad de TIMP1 respecto a los embriones de ratas sanas, se observó que tanto el tratamiento con folato como el tratamiento con folato en conjunto con la administración de una dieta rica en aceite de cártamo, aumentaron aún más la actividad de TIMP1 ($p < 0,05$) (Figura 33 B).



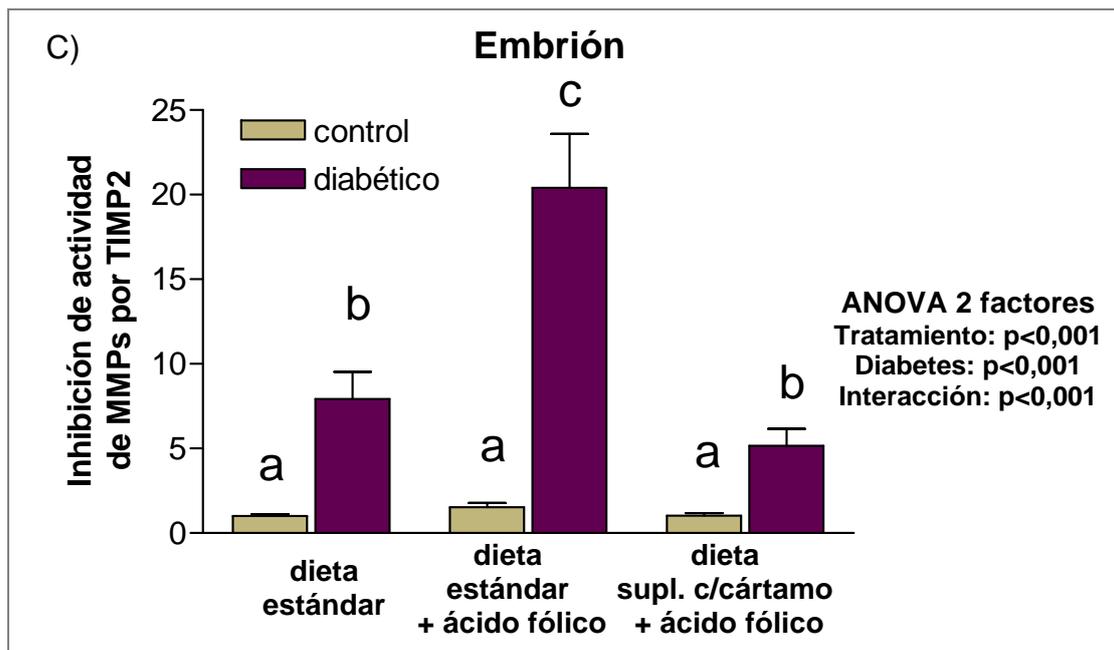
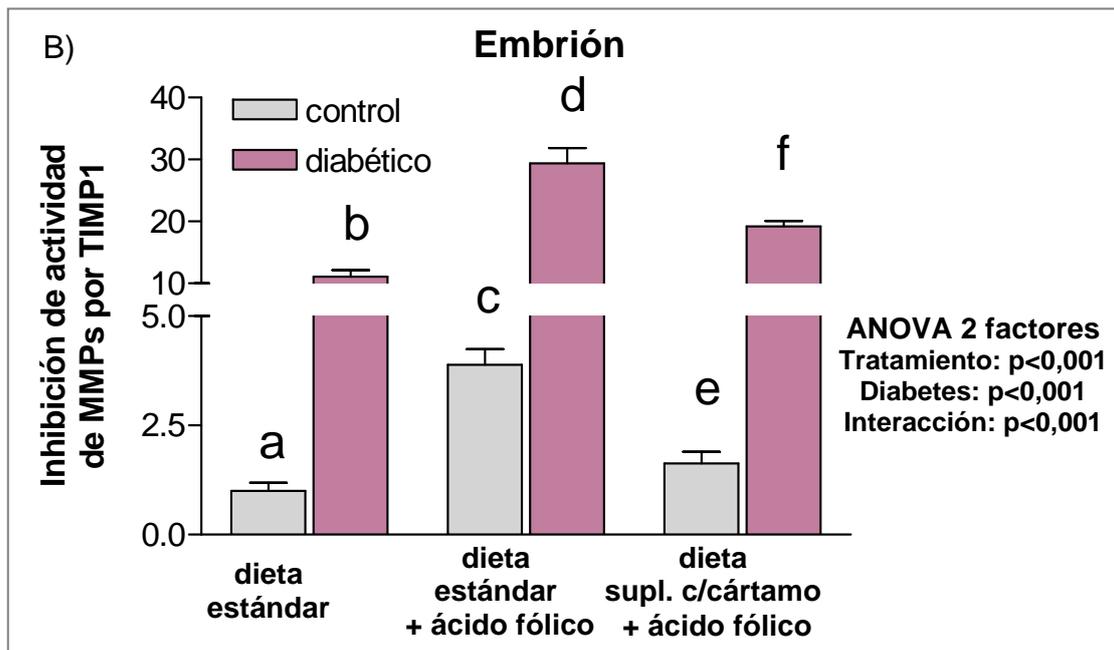


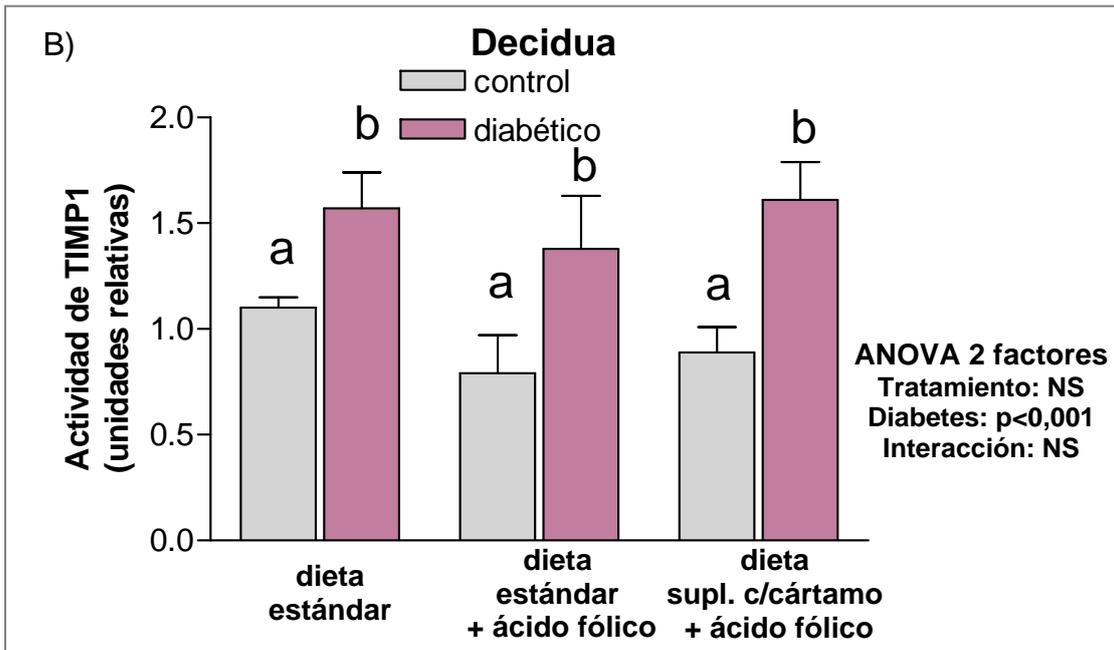
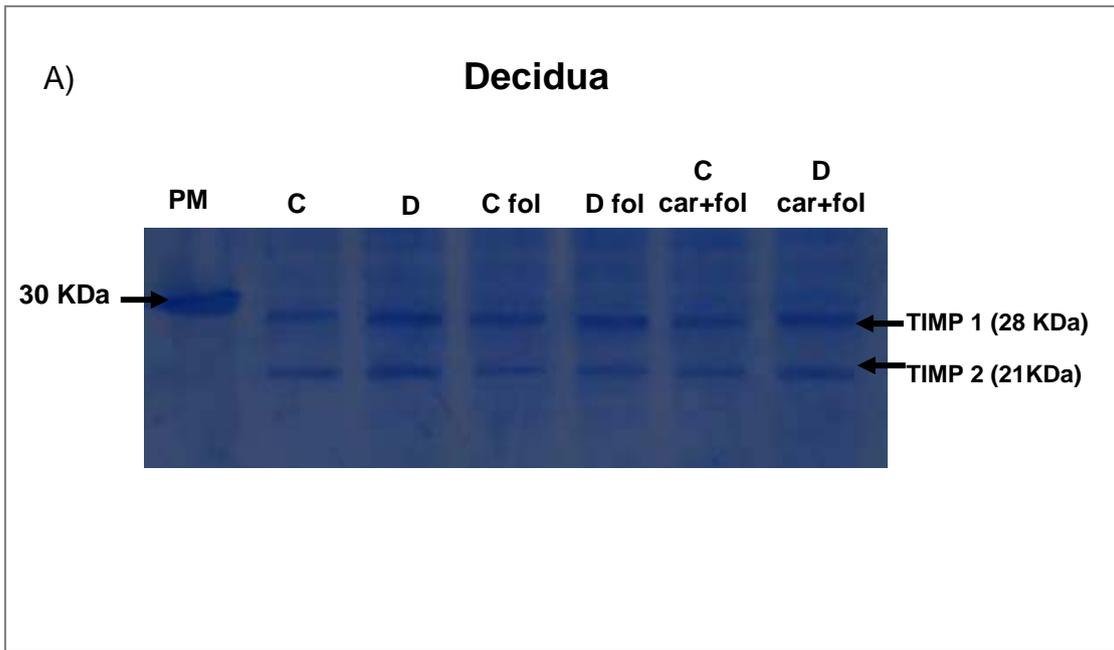
Figura 33. Zimografía reversa representativa (A) que muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg de ácido fólico solo o en conjunto con la suplementación dietaria con 6% de aceite de cártamo sobre la actividad inhibitoria de TIMP1 (A) y de TIMP2 (B) en el embrión de ratas sanas y diabéticas en periodo de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Cuando estudiamos la actividad de TIMP2 observamos que en los embriones de ratas controles, la actividad de esta proteína no se modificó con los tratamientos con ácido fólico y con ácido fólico en conjunto con la dieta suplementada con aceite de cártamo (Figura 33 C). En los embriones de ratas diabéticas, donde la actividad de TIMP2 es mayor en relación al control, el tratamiento con folato incrementó aún más la actividad de TIMP2 ($p < 0,01$) mientras que la administración conjunta de ácido fólico con una dieta rica en aceite de cártamo no tuvo efecto sobre la actividad de TIMP2 (Figura 33 C).

En cuanto al tejido decidual, se muestra en la Figura 34 A una zimografía reversa representativa donde se observan las bandas correspondientes a la inhibición de la actividad gelatinolítica por TIMP1 y TIMP2 en el tejido decidual de ratas sanas y diabéticas tratadas con administración de ácido fólico o de ácido fólico junto con una dieta suplementada con aceite de cártamo.

Al evaluar la actividad de TIMP1 en el tejido decidual, pudimos observar que la misma no se modificó en la decidua de ratas sanas con ninguno de los tratamientos consistentes en administración de ácido fólico o de ácido fólico junto a la dieta estándar suplementada con aceite de cártamo (Figura 34 B). En la decidua de rata diabética, donde la actividad de TIMP1 está incrementada en relación al control, tampoco se observó efecto del tratamiento con ácido fólico solo o en conjunto con la dieta enriquecida en aceite de cártamo (Figura 34 B).

De forma similar, al evaluar la actividad de TIMP2 se observó que la misma permaneció inalterada en las deciduas de ratas controles al someter a los animales a los tratamientos con folato y con folato junto a la dieta rica en aceite de cártamo (Figura 34 C). La actividad de TIMP2, incrementada en la decidua diabética en relación al control, tampoco se vió modificada con el tratamiento con ácido fólico solo o en conjunto con la dieta enriquecida en aceite de cártamo (Figura 34 C).



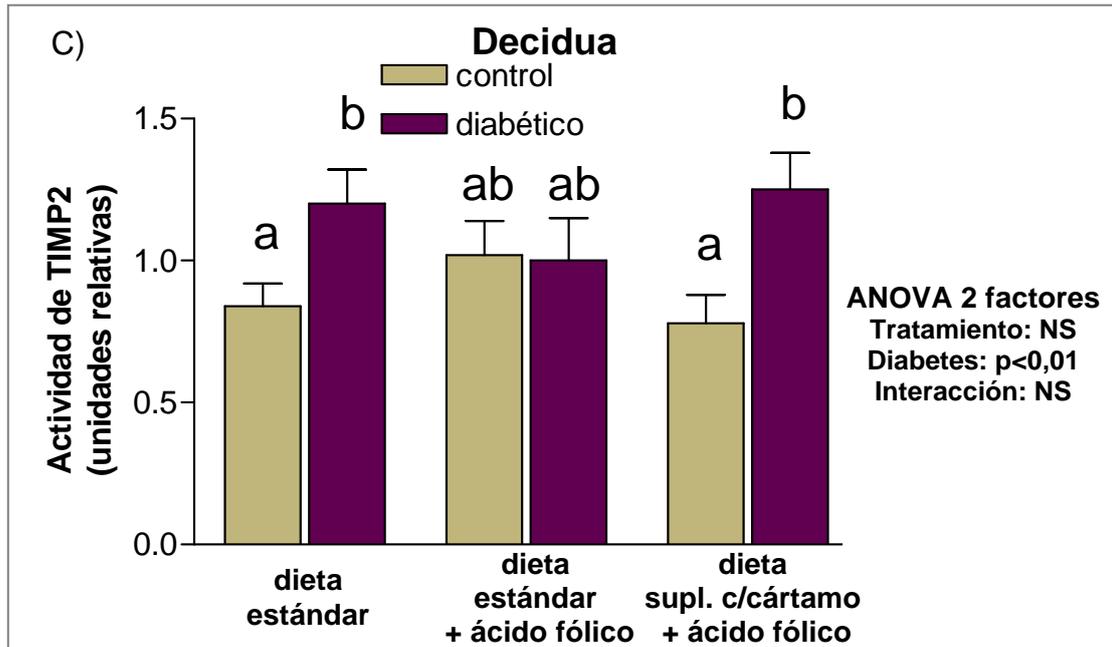


Figura 34. Zimografía reversa representativa (A) que muestra el efecto de la administración de 20 mg/Kg de ácido fólico solo o en conjunto con la suplementación dietaria con 6% de aceite de cártamo sobre la actividad inhibitoria de TIMP1 (B) y de TIMP2 (C) en la decidua de ratas sanas y diabéticas en periodo de organogénesis temprana. Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 8 ratas. Test estadístico: ANOVA 2X2 y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Balance MMPs/TIMPs *in situ* en el embrión y la decidua de ratas controles y diabéticas en periodo de organogénesis temprana

Dada las alteraciones observadas en la actividad de las MMPs y TIMPs en los embriones y deciduas de ratas diabéticas y la capacidad del tratamiento con ácido fólico de modular la actividad de los TIMPs, y del tratamiento con ácido fólico junto a la dieta enriquecida en aceite de cártamo de modular tanto la actividad de las MMPs como de los TIMPs, fue de interés estudiar el balance MMPs/TIMPs en embriones de ratas diabéticas tratadas con ácido fólico solo y en conjunto con una dieta enriquecida en aceite de cártamo.

El estudio del balance MMPs/TIMPs se realizó en cortes congelados de tejido embrionario y decidual mediante la técnica de zimografía *in situ*.

La proporción MMPs/TIMPs que se encuentra incrementada en las somitas, el tubo neural y corazón de los embriones de rata diabética en relación al control, disminuyó con el tratamiento diario de ácido fólico y se redujo aún más con el tratamiento de ácido fólico junto a una dieta rica en

aceite de cártamo, obteniéndose en este último caso valores similares al embrión de rata control ($p < 0,05$) (Figura 35 A y B).

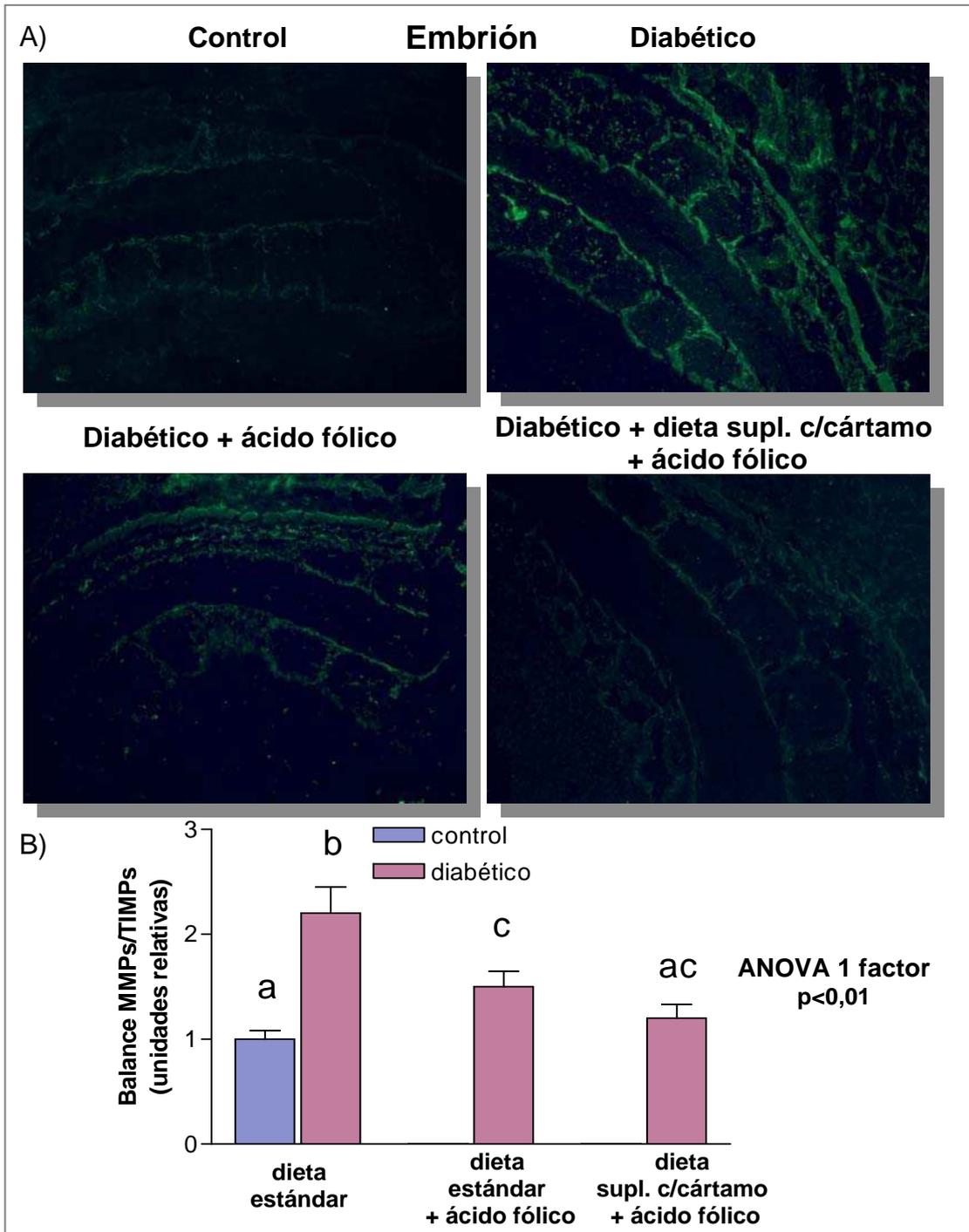


Figura 35. Zimografía *in situ* representativa de embriones de rata sana y diabética sin tratar y efecto de la administración de 20 mg/Kg de ácido fólico solo o en conjunto con la suplementación dietaria con 6% de aceite de cártamo sobre embriones de rata diabética (A). Cuantificación de la zimografía *in situ* (magnificación original: 200X) (B). Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 5 ratas. Test estadístico: t de student, ANOVA y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p < 0,05$). S: somitas.

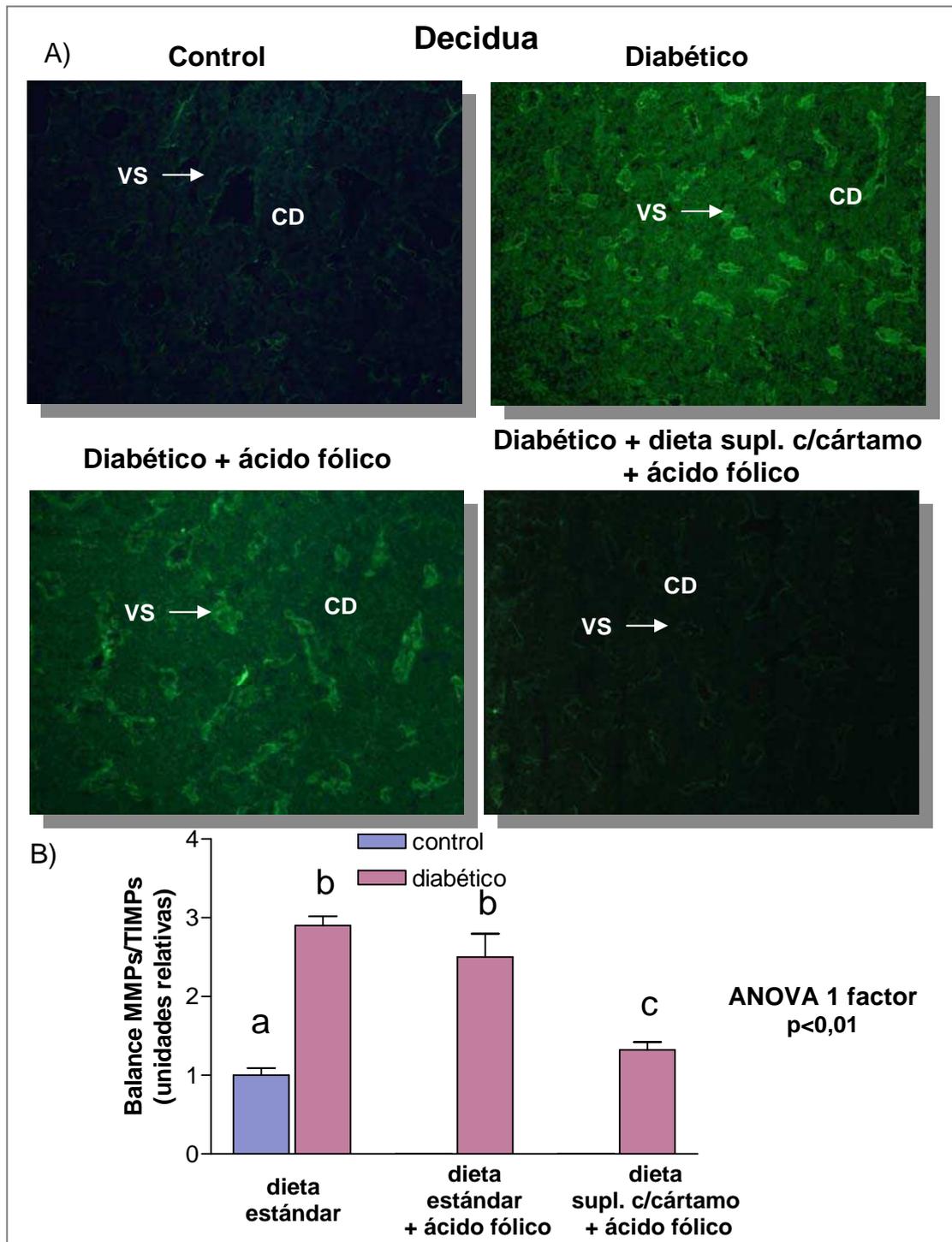


Figura 36. Zimografía *in situ* representativa de deciduas de rata sana y diabética sin tratar y efecto de la administración de 20 mg/Kg de ácido fólico solo o en conjunto con la suplementación dietaria con 6% de aceite de cártamo sobre deciduas de rata diabética (magnificación original: 100X) (A). Cuantificación de la zimografía *in situ* (B). Los datos expresan el promedio \pm error estándar. En cada grupo experimental se utilizaron muestras provenientes de 5 ratas. Test estadístico: t de student, ANOVA y post-test de Tukey. Diferentes letras expresan diferencias significativas ($p < 0,05$). CD: células deciduales; VS: vasos sanguíneos.

Al evaluar el balance MMPs/TIMPs *in situ* en el tejido decidua, observamos que en la decidua de rata diabética, donde la proporción MMPs/TIMPs está incrementada en las células deciduales y los vasos sanguíneos en relación al control, no se observan modificaciones con el tratamiento materno diario con ácido fólico, mientras que se observa una clara disminución con el tratamiento de ácido fólico administrado conjuntamente con una dieta suplementada con aceite de cártamo ($p < 0,001$) (Figura 36 A y B).



Discusión

El número de pacientes con diabetes mellitus tipo I, tipo II y gestacional se incrementa día a día en parte debido a los cambios alimenticios y al sedentarismo. Un estudio de Wild y colaboradores estima que mientras que el 2,8% de la población total padecía diabetes en el 2000, en el 2030 se incrementará al 4,4% (Wild y col. 2004). Las múltiples complicaciones de la patología, entre ellas las cardiopatías, retinopatías, nefropatías, neuropatías y pie diabético reducen la calidad y esperanza de vida de los pacientes. El desarrollo de complicaciones en la diabetes se encuentra asociado al estrés oxidativo característico de esta patología (Giacco y Brownlee 2010). La diabetes constituye una complicación de la gestación, considerándose la gestación en la diabetes un embarazo de riesgo. En efecto, la diabetes materna se asocia a elevados índices de aborto espontáneo, malformaciones congénitas, disfunción placentaria, morbilidad-mortalidad materna y neonatal y alteración de la programación intrauterina contribuyendo a la inducción de síndrome metabólico en las generaciones subsiguientes (Martinez-Frias 1994; Desoye y Shafrir 1996; Yang y col. 2006; Michael Weindling 2009; Simeoni y Barker 2009). Las dificultades en el estricto control metabólico a través de la dieta y/o de la administración de insulina durante la gestación afectan al desarrollo gestacional y aún en mujeres bajo tratamiento, las malformaciones congénitas prevalecen en los hijos de madres diabéticas (Yang y col. 2006).

En este trabajo se estudiaron probables vías de inducción de malformaciones embrionarias por la diabetes materna y se evaluaron tratamientos en modelos animales de diabetes plausibles de ser

administrados a embarazadas diabéticas para prevenir dichas malformaciones. Se utilizó un modelo de diabetes experimental en rata obtenido por administración de estreptozotocina a animales adultos obteniendo animales que cursan glucemias que rondan los 400 mg/dl, compatibles con la preñez (Jawerbaum y White 2010). Dicho modelo de diabetes experimental presenta una elevada tasa de malformaciones embrionarias (alrededor del 14%) lo que facilita el estudio de las mismas.

Hemos avocado el estudio al período de organogénesis temprana embrionaria dado que es el período de mayor susceptibilidad para el desarrollo de malformaciones embrionarias (Eriksson y col. 2003). En este periodo, el embrión se encuentra rodeado de la decidua, tejido que le provee de sustento, nutrientes y compuestos que son necesarios para su normal desarrollo. Además, la decidua en un periodo posterior dará origen a la parte materna de la placenta. Por todo esto, es importante el estudio de la decidua ya que alteraciones en este tejido condicionarán el normal desarrollo embrionario y placentario.

Al evaluar parámetros embrionarios de crecimiento y desarrollo se observa una disminución en el contenido proteico embrionario y en el número de somitas en los embriones de ratas diabéticas en relación al control, lo que indica que existe un retardo en el crecimiento y desarrollo embrionario inducido por la diabetes. En diferentes modelos experimentales de diabetes, el balance entre el exceso de nutrientes y el daño celular condicionan el mayor o menor grado de crecimiento y desarrollo embrionario y fetal (Jawerbaum y White 2010). También en humanos se observa que si bien la diabetes materna usualmente genera macrosomía evidente en la gestación a término, cuando la diabetes es severa induce retardo de crecimiento intrauterino, anomalía que se evidencia desde etapas más tempranas de la gestación (Van Assche y col. 1998).

Al igual que en humanos, donde es sabido que la diabetes induce un incremento en la tasa de malformaciones congénitas (Martinez-Frias 1994), se observa que el modelo experimental de diabetes utilizado presenta una tasa elevada de malformaciones embrionarias y un incremento del número de reabsorciones embrionarias. Se sabe que la diabetes afecta a diferentes estadios de la preñez, inclusive desde la ovulación y estadios preimplantatorios (Moley 2001). Se observan alteraciones en el metabolismo

del ácido araquidónico y del NO tanto en el ovocito y el blastocisto como en el útero que lo recibe (Jawerbaum y Gonzalez 2005). De esta forma, un incremento en la tasa de reabsorciones podría ser el reflejo de alteraciones en los procesos de ovulación, implantación o de malformaciones incompatibles con la vida inducidas por la diabetes materna.

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPARs) han sido ampliamente estudiados en el desarrollo de opciones terapéuticas para el tratamiento de la diabetes ya que los mismos son receptores nucleares que controlan la expresión de genes involucrados en la insulino resistencia, el control inflamatorio y el metabolismo lipídico (Michalik y col. 2002). Conociendo el efecto del desbalance metabólico, los procesos pro-inflamatorios en el desarrollo embrionario y feto-placentario en la diabetes materna (Jawerbaum y Gonzalez 2006) y la deficiencia en ácidos grasos esenciales agonistas de PPARs inducida por la diabetes, nuestro grupo de trabajo evalúa el rol de PPARs en el desarrollo intrauterino en modelos experimentales de diabetes (Jawerbaum y Capobianco 2010).

En este trabajo estudiamos la expresión de PPARs en el tejido decidual y en el embrión de rata sana y con diabetes. Observamos que tanto PPAR δ como PPAR γ y PPAR α se encuentran presentes tanto en la decidua de rata sana como diabética en etapa de organogénesis temprana; mientras que sólo PPAR δ se encuentra en el embrión en esta etapa del desarrollo. Varios trabajos reportan que PPAR δ es el único de los PPARs que se expresa en el embrión en período de organogénesis temprana (Michalik y col. 2002; Abbott 2009), siendo ésta la primera vez que se describe la expresión de PPARs a nivel decidual.

Los estudios muestran la expresión de PPAR δ en el estadio de blastocisto donde la activación de este receptor mediante la PGI₂, su agonista endógeno, se encuentra involucrada en los procesos de implantación embrionaria y decidualización (Lim y Dey 2000). De forma interesante, en nuestro trabajo hemos encontrado que tanto PPAR δ como su agonista PGI₂, se encuentran disminuidos tanto en la decidua como en el embrión de rata diabética, lo que seguramente contribuye a que tanto los procesos de implantación y decidualización no se desarrollen normalmente en las ratas diabéticas, colaborando a la inducción de los incrementos observados en las tasas de reabsorciones y malformaciones embrionarias que presentan estas ratas.

Así como encontramos disminuciones en los niveles de PGI₂, los niveles de PGE₂, otro importante prostanoide involucrado en la morfogénesis embrionaria, también se encontraron disminuídos en el embrión de rata diabética. Estos estudios corroboran hallazgos previos (Wentzel y col. 1999; Jawerbaum y col. 2000). En efecto, Piddington y colaboradores han estudiado el embrión de ratón durante el proceso de neurulación, encontrando niveles reducidos de PGE₂ que se relacionan con el elevado índice de malformaciones en el cierre del tubo neural inducido por la diabetes materna (Piddington y col. 1996). En este trabajo observamos también que los niveles reducidos de PGE₂ en el embrión de rata diabética se correlacionan con el elevado índice de malformaciones, entre las cuales se encuentran en alta proporción las inducidas por un cierre defectuoso del tubo neural. Se conoce que el embrión sintetiza PGE₂ desde estadios tempranos (Ni y col. 2003). La PGE₂ puede ser sintetizada mediante la PGE₂ sintasa citosólica dando lugar a PGE₂ que en su mayoría se liberará extracelularmente para actuar en forma parácrina sobre receptores de PGE₂ ubicados en la membrana plasmática o mediante la PGE₂ sintasa microsomal que se encuentra en la membrana nuclear (Gobeil y col. 2003). En neuronas y en células endoteliales de la microvasculatura cerebral se ha observado que la expresión de receptores para PGE₂ ubicados en la membrana nuclear regula la transcripción génica de eNOS (Bhattacharya y col. 1998; Gobeil y col. 2002). En conjunto esto nos hace pensar que la PGE₂ necesaria para el proceso de cierre del tubo neural sea la que es sintetizada por la PGE₂ sintasa localizada en el núcleo de las células embrionarias y que actuaría a nivel de los receptores que se encuentran en la membrana nuclear de las células del tubo neural. De esta forma se explicarían las diferencias que surgen al analizar los niveles y función de la PGE₂ en el embrión en desarrollo donde cumpliría una función morfogénica y en la decidua, donde ejercería un rol pro-inflamatorio. En este estudio verificamos que el efecto de la diabetes sobre los prostanoideos es específico para cada uno de ellos en los diferentes tejidos y parece no ser general sobre la ciclooxigenasa o fosfolipasa, ya que el TXA₂, otro derivado del ácido araquidónico, a diferencia de la PGI₂ y PGE₂, se encuentra incrementado en el embrión de rata diabética en relación al control.

Al estudiar el tejido decidual observamos que la PGE₂ se encuentra aumentada en la decidua de rata diabética, lo cual podría estar indicando un incremento en el estado inflamatorio inducido por la diabetes. Se ha observado que pacientes diabéticos poseen niveles incrementados de PGE₂ circulatoria en asociación con complicaciones de tipo inflamatorio (Izuora y col. 2005) y más aún el exceso de esta prostaglandina tiene propiedades pro-inflamatorias en el tejido uterino y placentario (Jawerbaum y Gonzalez 2006).

Es sabido que la diabetes materna induce un ambiente pro-inflamatorio que afecta el normal desarrollo intrauterino (Pampfer y col. 1997; Jawerbaum y Gonzalez 2006; Myatt 2010). En modelos experimentales de diabetes, tanto el útero durante el período de implantación, como la placenta y el feto en desarrollo presentan una sobreproducción de agentes pro-inflamatorios. En estos tejidos, hay un aumento de las especies reactivas del oxígeno, citoquinas y prostaglandinas pro-inflamatorias, óxido nítrico y peroxinitritos (Kossenjans y col. 2000; Viana y col. 2000; Jawerbaum y Gonzalez 2005; Pustovrh y col. 2005).

El óxido nítrico cumple un rol fundamental en el proceso de angiogénesis, que tiene lugar tanto durante la decidualización como en la formación de la placenta (Reynolds y Redmer 2001; Hemberger y col. 2003). La vasculogénesis se inicia en el saco vitelino antes que en el embrión y se observa que durante este proceso el saco vitelino expresa tanto iNOS como eNOS en forma secuencial y que la regulación en la producción de NO es fundamental para un desarrollo vascular normal (Nath y col. 2004). Además, durante la organogénesis embrionaria, el NO es un morfógeno y ya es consensuada la idea de que son necesarios adecuados niveles de NO para una correcta morfogénesis (Young y col. 2002; Plachta y col. 2003). En forma clara se observó en embriones de rata de día 10.5 de gestación que tanto un exceso de NO como una inhibición en la síntesis de este compuesto inducían defectos en el cierre del tubo neural (Lee y Juchau 1994) y que ratones knockout para iNOS no presentan malformaciones embrionarias con la inducción de diabetes (Sugimura y col. 2009).

La literatura nos muestra que la hiperglucemia induce incrementos en los niveles de NO en diversos tejidos como en el útero, en el saco vitelino, el oocito, en el embrión preimplantatorio y durante la organogénesis (Jawerbaum y col. 1998; Novaro y col. 1998; Jawerbaum y col. 2002; Nath y

col. 2004; Jawerbaum y Gonzalez 2005). En este estudio hemos evaluado los niveles de NO a través de sus metabolitos estables, los nitratos/nitritos, encontrando niveles incrementados de los mismos no solo en los embriones sino también en la decidua de rata diabética.

Siguiendo con el estudio de los procesos pro-inflamatorios inducidos a nivel intrauterino por la diabetes, hemos evaluado los niveles de lipoperóxidos que se originan por oxidación de ácidos grasos poliinsaturados por especies reactivas del oxígeno o peroxinitritos (Adibhatla y Hatcher 2008). Los lipoperóxidos pueden reaccionar propagando su propia generación y oxidando tanto las proteínas como el ADN generando de esta forma daño celular (Spiteller 2006). La observación de niveles incrementados de lipoperóxidos en el embrión y la decidua de rata diabética, nos indica la existencia de un incremento en las especies reactivas de oxígeno y su consecuente toxicidad durante el desarrollo en etapa de organogénesis temprana, hallazgos que corroboran estudios previos que identifican el daño oxidativo embrionario y su vinculación con la inducción de malformaciones congénitas (Wentzel y Eriksson 2002; Morgan y col. 2008).

Acorde con los elevados niveles de NO y especies reactivas de oxígeno hallados, también observamos un incremento en la inmunomarcación para nitrotirosina en el embrión y la decidua de rata diabética. Un incremento en residuos de tirosina nitrados nos indica la presencia de niveles incrementados de peroxinitritos formados a partir de la reacción del NO· con el O₂⁻, siendo los peroxinitritos agentes altamente oxidantes que inducen daño celular oxidando lípidos, ADN y proteínas. Dado que en la decidua diabética la marcación para nitrotirosina se localiza en la zona mesometrial donde se encuentran las lagunas sanguíneas y donde ocurre la formación de la placenta, esto podría generar defectos en la formación de la misma. Debe considerarse que los peroxinitritos regulan en forma post-traducciona la actividad de múltiples proteínas, generándose ante su exceso alteraciones en la actividad de ciertas enzimas, en la tasa de degradación proteica y modificaciones en la transducción de señales celular (Webster y col. 2008). Una de las enzimas susceptible de ser nitrosilada es la PGI₂ sintasa (Zou y col. 1999) y éste podría ser un mecanismo involucrado en los menores niveles de PGI₂ encontrados tanto en el embrión como en la decidua de rata diabética.

Un ambiente pro-inflamatorio afecta también la actividad de las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMPs). Tanto el óxido nítrico como las especies reactivas del oxígeno pueden regular la actividad de las MMPs, enzimas involucradas en la remodelación de la matriz extracelular (Pustovrh y col. 2005; Pustovrh y col. 2007).

La actividad de las MMPs es requerida durante el desarrollo, la misma se encuentra involucrada en la degradación de moléculas de la matriz extracelular (MEC) permitiendo la migración de células, modificando el microambiente de la MEC induciendo de esta manera procesos de proliferación, apoptosis o morfogénesis, y modulando la actividad de moléculas como los factores de crecimiento, mediante su clivaje directo o liberándolos de su unión a la MEC (Vu y Werb 2000).

La actividad de las MMP2 y MMP9 se asocia a los procesos reproductivos y se observa en el oocito, el blastocisto y el embrión a comienzos de la gastrulación (Brenner y col. 1989; Mogi y Toyozumi 2010). La diabetes afecta la actividad de las MMPs y se ha observado que en plasma de pacientes diabéticos, los niveles de la MMP2 y MMP9 están incrementados (Derosa y col. 2007). También se observa un incremento en la actividad de las MMP2 y MMP9 en placentas de ratas diabéticas y de la MMP2 en fetos de ratas diabéticas (Pustovrh y col. 2005).

En nuestro trabajo, en el embrión de rata diabética observamos que existe un incremento de la actividad de la MMP9 como así también de la MMP2 en su forma activa y latente. Observamos también un incremento en la expresión proteica de MMP9 y MMP2 en el embrión de rata diabética. Estos resultados muestran por primera vez alteraciones en la actividad de MMPs en el embrión en período de organogénesis temprana, alteraciones que posiblemente condicionen el desarrollo embrionario en esta etapa de alta susceptibilidad para la inducción de malformaciones congénitas.

En cuanto a la decidua, se ha reportado la expresión y actividad de la MMP9 en las células gigantes del trofoblasto que invaden la decidua de ratón durante el proceso de implantación; también se observó actividad de MMP9 en los decíduomas, mientras que la MMP2 se encuentra inicialmente en la zona decidual primaria y luego de la implantación en la zona de la decidua mesometrial (Alexander y col. 1996; Das y col. 1997). Poco se sabe de la acción de estas enzimas durante la organogénesis temprana, momento en el que la decidua se encuentra sufriendo grandes remodelaciones; en la

zona mesometrial tiene lugar el proceso de angiogénesis en el que las MMPs participan de forma activa (Schnaper y col. 1993; Hemberger y col. 2003) (Mandal y col. 2003). Además, paralelamente ocurre el proceso de involución decidual para dar origen a la parte materna de la placenta, por lo que es de esperar la existencia de gran actividad de MMPs.

En nuestro trabajo observamos que la decidua de rata en etapa de organogénesis temprana expresa MMP9 y MMP2 y que ambas proteínas tienen actividad enzimática. Además, la decidua de rata diabética presenta un incremento en la actividad de la MMP9, y la inmunomarcación de la MMP9 nos muestra también un incremento en los niveles proteicos de dicha enzima. Respecto a la MMP2 en la decidua de rata diabética y, dado que una de las ventajas de la técnica de zimografía es que nos permite estudiar la actividad de la forma activa y latente de las MMPs, observamos un incremento en la actividad de la forma latente de la MMP2 que se relacionaría con la formación de un reservorio de enzima que puede ser rápidamente activado bajo determinadas condiciones, tanto fisiológicas como patológicas. Observamos también en este tejido, un incremento en la expresión proteica de la MMP2.

El incremento, tanto en la actividad de la MMP9 como de la MMP2 en las deciduas de las ratas diabéticas podría inducir defectos en la angiogénesis decidual afectando al desarrollo embrionario y generando en un período posterior alteraciones en la función placentaria que condicionará el desarrollo fetal. En efecto, anomalías en la actividad de las MMPs han sido vinculadas a varias enfermedades gestacionales como la preeclampsia y la ruptura prematura de la membrana corioamniótica (Merchant y Davidge 2004; Vadillo-Ortega y Estrada-Gutierrez 2005).

Las MMPs cumplen sus roles fisiológicos cuando están estrictamente reguladas y participan en múltiples procesos patológicos ante su desregulación (Mandal y col. 2003; Rosenberg 2009). Dicha regulación se ejerce a nivel de su transcripción, la activación del zimógeno y la regulación de su actividad a través de modificaciones postraduccionales y mediante la unión de los inhibidores tisulares de las MMPs, conocidos como TIMPs.

Los TIMPs se caracterizan por su acción de inhibir a las MMPs aunque también se ha descrito su rol en los procesos de angiogénesis, proliferación celular y apoptosis actuando de forma independiente de las MMPs (Lambert y col. 2004).

TIMP1 y 2 se encuentran presentes en la placenta humana en el primer trimestre de gestación. Los niveles de TIMP2 se encuentran disminuidos en placentas con enfermedad trofoblástica gestacional (Okamoto y col. 2002). Alexander y colaboradores evaluaron en la decidua de ratones la expresión de TIMPs desde el inicio de la implantación hasta el comienzo del período de organogénesis embrionaria observando que la expresión de TIMP1 se incrementa en las células deciduales desde inicios de la implantación y a lo largo del período evaluado, mientras que la expresión de TIMP2 se mantiene constante durante dicho periodo y TIMP3 se expresa en gran cantidad durante la implantación pero sus niveles de RNAm declinan hasta hacerse imperceptibles a comienzos del período de organogénesis temprana (Alexander y col. 1996). Varios trabajos reportan ausencia de TIMP3 en la decidua y el embrión en períodos post-implantatorios (Nuttall y Kennedy 1999) pero de forma interesante, su expresión vuelve a observarse en el feto, la placenta murina y en el útero post-parto de rata (Apte y col. 1994; Pustovrh y col. 2009).

En forma acorde a lo reportado, en nuestro trabajo observamos por inmunohistoquímica que la marcación de TIMP3 es débil en el embrión en organogénesis y se observa en las células gigantes del trofoblasto pero no en las células deciduales. Además, mediante la técnica de western blot, detectamos niveles muy disminuidos de dicha proteína en la decidua.

La expresión de TIMP1 y TIMP2 se localizó en el embrión y las células deciduales y se corroboró en el tejido decidual mediante western blot. Además, observamos un incremento en la actividad de TIMP1 y TIMP2 tanto en el embrión como en la decidua de rata diabética. En otros trabajos se ha observado un incremento en la expresión plasmática de TIMP1 y TIMP2 en pacientes diabéticos (Derosa y col. 2007) y también incrementos de la expresión de TIMP1 a nivel glomerular en ratas diabéticas (Shankland y col. 1996), lo que sugiere que existiría una respuesta compensatoria que regula positivamente la expresión de TIMPs ante la hiperglucemia materna y probablemente en respuesta al incremento de la mayor actividad metaloproteásica.

Dadas las alteraciones en los niveles y actividad de MMPs y TIMPs a nivel embrionario y decidual, decidimos realizar una zimografía *in situ* que nos permite estudiar el balance MMPs/TIMPs. Observamos que existe un incremento en la relación MMPs/TIMPs en el embrión y la decidua de rata

diabética en relación al control. Es decir, que a pesar del incremento en la actividad de TIMPs observados en los embriones y deciduas de rata diabética, los mismos no son suficientes para reducir la incrementada actividad metaloproteásica presente en estos tejidos.

En conjunto, estos resultados nos muestran la existencia de importantes alteraciones que poseen tanto el embrión como la decidua de rata diabética respecto a los niveles del receptor nuclear PPAR δ , al metabolismo del ácido araquidónico, al estado inflamatorio y a la actividad de los remodeladores de la matriz extracelular, anomalías que marcan un conjunto de vías metabólicas y de señalización aberrantes en el propio embrión y su entorno, posibles causantes del daño embrionario y en el posterior desarrollo feto-placentario en la diabetes materna. En base a estos hallazgos, conociendo las propiedades antiinflamatorias de los PPARs en diferentes tejidos (Moraes y col. 2006) y sabiendo además que el ácido fólico es un compuesto que, administrado de forma periconcepcional, previene el desarrollo de malformaciones congénitas, nos interesamos en estudiar el posible efecto benéfico de la suplementación de la dieta materna con aceites enriquecidos en agonistas de PPARs y de la administración materna de ácido fólico solo o en conjunto con una dieta enriquecida en aceites agonistas de PPARs.

Para estudiar en este trabajo el efecto de ácidos grasos insaturados, agonistas de PPARs, sobre el embrión y la decidua en etapa de organogénesis temprana, tratamos a la rata entre los días 0.5 a 10.5 de gestación con una dieta estándar (5% de contenido graso, control), o con suplemento del 6% de aceite de oliva o aceite de cártamo, conociéndose que el contenido graso dietario normal de la rata es entre 5% y 11% (Council 1995; Jebelovszki y col. 2008). Todas estas dietas cumplen con los requisitos de calorías, proteínas, grasas y carbohidratos para la alimentación de ratas preñadas establecidos por el Comité de Nutrición Animal, Subcomité de Nutrición de Animales de Laboratorio del Consejo Nacional de Investigaciones, de Estados Unidos (Council 1995) y fueron utilizadas previamente durante la gestación de rata, poseen semejante valor calórico y no generan diferencias en el peso del animal (Capobianco y col. 2008; Capobianco y col. 2008).

Si bien es sabido que el ácido linoleico (presente en un 75% en el aceite de cártamo) y su derivado ácido araquidónico activan los tres isotipos de PPARs, estudios realizados en células transfectadas con la secuencia de ADN de unión de PPARs (PPRE) y un gen reportero y de competencia de radioligandos, evidencian que también el ácido oleico, presente en el aceite de oliva en un 75%, activa los tres isotipos de PPARs, aunque con menor afinidad que los ácidos grasos poliinsaturados (Forman y col. 1997; Xu y col. 1999). Además, recientemente se observó que el ácido oleico mediante la activación de PPAR γ , revierte el efecto inhibitorio de producción de insulina inducido por TNF- α *in vitro* en una línea de células β -pancreáticas de rata y este efecto se observa también mediante la administración del ácido oleico *in vivo* en la dieta de los ratones (Vassiliou y col. 2009). También se ha observado que el ácido oleico a través de la activación de PPAR δ se encuentra involucrado en la diferenciación neuronal (Di Loreto y col. 2007).

Se destaca asimismo, que tanto los ácidos grasos poliinsaturados como los ácidos grasos monoinsaturados administrados en forma dietaria, pueden actuar sobre los PPARs tanto en la decidua como en el embrión, ya que se ha observado que los mismos son transportados a través del saco vitelino (Farese y col. 1996; Herz y Farese 1999).

En este trabajo observamos que la acción de los tratamientos dietarios es independiente de cambios en la glucemia materna. Además, en todos los grupos diabéticos tanto la glucemia como el consumo energético se encontró incrementado por igual. Sabemos que la glucemia alterada es producto del déficit insulínico que induce la diabetes, y que también esta falta de acción insulínica conlleva a una mala utilización de los sustratos metabólicos que se asocia al mayor consumo energético (Krishnamachar y Canolty 1986).

En nuestro trabajo observamos que los tratamientos tanto con el aceite enriquecido en ácido oleico como linoleico mejoran parámetros de crecimiento embrionario y que el que brinda ácidos grasos poliinsaturados también mejora parámetros de desarrollo embrionario. Sabemos que en la diabetes materna existe un déficit de ácidos grasos esenciales, como el ácido araquidónico, ácido graso derivado del ácido linoleico, imprescindible para el desarrollo embrionario (Reece 1999; Cetin y col. 2009). Nuestros estudios mostraron que dietas suplementadas con ácidos grasos

insaturados revierten parcialmente el retardo de crecimiento observado en los embriones de rata diabética. Dado que el déficit de ácidos grasos esenciales maternos se relaciona con retardo de crecimiento intrauterino, probablemente sea por esto que el tratamiento con el aceite de cártamo, rico en ácido linoleico haya sido el más efectivo en revertir anomalías en parámetros de crecimiento y desarrollo (Zhang 1997). En efecto, se conoce que los ácidos grasos poliinsaturados ejercen múltiples vías regulatorias, siendo la activación de PPARs una importante vía a través de la cual ejercen su acción. Dado que el ácido oleico es un ácido graso monoinsaturado que también activa PPARs, el hecho de que el tratamiento con el ácido oleico también ejerza efectos positivos sobre parámetros de crecimiento, nos sugiere que la activación de PPAR δ , único isotipo de PPAR presente en el embrión, se encuentra involucrada en la prevención del retardo de crecimiento embrionario.

En este estudio, se destaca el resultado beneficioso de los tratamientos dietarios con agonistas de PPARs en la prevención de la reabsorción embrionaria. La activación de PPAR δ es fundamental para una correcta implantación embrionaria (Lim y Dey 2000) y hemos observado que tanto PPAR δ como su ligando endógeno, la PGI₂, se encuentran disminuidos tanto en el embrión como la decidua de rata diabética, por lo que seguramente existan defectos del desarrollo iniciados por una implantación defectuosa. En este sentido la administración de agonistas de PPAR δ podría estar corrigiendo este defecto en la rata diabética, mejorando de esta forma el desarrollo postimplantatorio.

La activación de PPARs mediante agonistas dietarios administrados a la rata diabética, mejora aunque no revierten completamente la tasa de malformaciones embrionarias que se encuentra incrementada en los embriones de rata diabética. Es por esto que quisimos indagar en el posible efecto benéfico del tratamiento con ácido fólico administrado a la rata diabética preñada. Es sabido que el ácido fólico es necesario para un normal desarrollo embrionario, y que en ratones la deficiencia de ácido fólico en la dieta materna induce retraso de crecimiento intrauterino junto a un incremento en la tasa de reabsorción y malformación embrionaria (Li y col. 2005), alteraciones similares a las observadas en nuestro modelo de diabetes experimental. De hecho, valores séricos disminuidos de ácido fólico se han observado en individuos con diabetes (Giannattasio y col. 2010) y se

prescribe la ingesta de ácido fólico en el período periconcepcional de embarazadas diabéticas en dosis mayores que en la población en general (SAD 2010). Los estudios poblacionales indican el amplio beneficio de la suplementación de folatos en la reducción del índice de malformaciones congénitas en la población general y se aconseja su ingesta en mujeres con antecedentes de malformaciones congénitas y en poblaciones de riesgo de inducción de malformaciones congénitas como las mujeres diabéticas gestantes, si bien no hay estudios específicos que hayan evaluado el efecto de la suplementación con ácido fólico en embarazadas con diabetes (CDC U.S. Department of Health 1992).

Observamos que el tratamiento con ácido fólico no modifica el contenido proteico embrionario ni solo ni al administrarse a los animales en conjunto con la dieta enriquecida en aceite de cártamo. Pero tanto el tratamiento con ácido fólico solo o administrado en conjunto con la dieta rica en aceite de cártamo a las ratas diabéticas, incrementan el número de somitas a valores similares al embrión de rata control, mostrándonos que el metabolismo del ácido fólico alterado se encuentra vinculado a un retraso en el desarrollo de los embriones de ratas diabéticas.

Además, deficiencias de ácido fólico dietario o alteraciones en el metabolismo del mismo han sido vinculadas a incrementos en la tasa de reabsorciones embrionarias (Li y col. 2005). En este trabajo observamos que el número de reabsorciones, incrementado en la rata diabética, disminuye a valores similares al control tanto con el tratamiento con ácido fólico como con ácido fólico junto a la dieta suplementada con aceite de cártamo, mostrándonos el claro beneficio de estos tratamientos ejercido posiblemente desde el período implantatorio.

Es importante destacar que las malformaciones embrionarias, incrementadas en el embrión de rata diabética, disminuyen parcialmente con el tratamiento de folato solo y revierten totalmente con el tratamiento de folato junto a la dieta enriquecida en aceite de cártamo. Esto nos muestra la existencia de un efecto sinérgico en la administración de ácido fólico en conjunto con activadores dietarios de PPARs para el tratamiento de las malformaciones embrionarias inducidas por la diabetes. Se destaca la relevancia de este hallazgo que podría conducir a terapéuticas aplicables a la gestación diabética humana, donde no se logra reducir el índice de malformación embrionaria a valores semejantes a los de la población sana.

Con la intención de profundizar en los mecanismos de inducción y prevención de las alteraciones embrionarias en la diabetes materna, evaluamos el efecto de las dietas suplementadas con aceite de oliva y cártamo sobre los niveles de diferentes prostanoides como la PGI₂, agonista endógeno de PPAR δ , en los embriones y deciduas de ratas. En los embriones de ratas sanas se observa un incremento de PGI₂ con ambos tratamientos dietarios lo que nos indica que, además de brindar la dieta rica en aceite de cártamo el precursor de la síntesis de esta prostaglandina, ambas dietas estarían ejerciendo mecanismos de acción comunes, posiblemente a través de la activación de PPAR δ , que conducen a una vía de retroalimentación positiva en donde los mismos activadores de PPAR δ inducen incrementos en el agonista endógeno del mismo receptor. Ante la capacidad de PGI₂ de regular procesos de vasodilatación y angiogénesis, se destaca la capacidad de dietas ricas en agonistas de PPARs de regular sus niveles. El incremento de PGI₂ en la decidua de rata sana se observa solo con el tratamiento con la suplementación dietaria con el aceite de oliva, la capacidad de dietas suplementadas con aceite de oliva de incrementar niveles de PGI₂ ha sido previamente observada en tejido aórtico de ratas preñadas (Blankenship y col. 1989). Es interesante que sólo la dieta enriquecida en aceite de cártamo logre incrementar los niveles de PGI₂ en los embriones y deciduas de ratas diabéticas, postulándose que la mayor efectividad de este tratamiento puede deberse a que una dieta enriquecida en ácido linoleico además de activar la vía de PPARs, incrementa directamente los niveles de ácido araquidónico, precursor de la síntesis de prostaglandinas. Reforzando esta idea, observamos también que la PGE₂ que se encontraba disminuida en los embriones de ratas diabéticas en relación al control, si bien se incrementa con el tratamiento con el aceite de oliva, se incrementa aún más con el aceite de cártamo, observándose con este último incluso un incremento en los embriones de ratas sanas.

Es interesante que tanto la PGI₂ como la PGE₂ tienen roles importantes durante el proceso de implantación y organogénesis embrionaria y que ambas actúan facilitando estos procesos de desarrollo. Ratones hembra PPAR δ -/- tienen fallas en la implantación, aunque la misma no está completamente inhibida porque una mayor acción de PGE₂ compensa parcialmente la pérdida de PPAR δ (Wang y col. 2007); además, tanto la PGE₂ como la PGI₂ agregados *in vitro* revierten la inhibición de la

fusión del tubo neural que induce la hiperglucemia en embriones de ratones en cultivo (Baker y col. 1990).

De esta forma se sugiere que uno de los mecanismos involucrados en la reversión de las alteraciones observadas en el desarrollo embrionario y en las tasas de reabsorción y malformación embrionarias inducidas por la diabetes sea mediado por un incremento en los niveles embrionarios de PGI₂ y PGE₂ inducido por los tratamientos dietarios administrados a las ratas diabéticas.

Diferencias importantes surgen al analizar el embrión y el tejido decidual en relación al efecto de las dietas enriquecidas en agonistas de PPARs sobre los niveles de PGE₂ y, si bien futuros estudios deberán indagar en los mecanismos involucrados, es claro el rol morfógeno de PGE₂ en el embrión (Piddington y col. 1996) y la función pro-inflamatoria que ejerce esta prostaglandina a nivel decidual en forma similar a la que se evidencia en diferentes tejidos del individuo diabético adulto (Izuora y col. 2005; Jawerbaum y Gonzalez 2006). Ante el incremento de PGE₂ en la decidua de rata diabética, nosotros observamos que los tratamientos dietarios con aceites de oliva y cártamo disminuyen los niveles de esta prostaglandina tanto en la decidua de rata sana como diabética, ejerciendo, de esta forma, un rol anti-inflamatorio. Además, es importante destacar que en la decidua, a diferencia del embrión donde sólo se expresa PPAR δ , se expresan las tres isoformas del receptor y esto puede explicar la respuesta diferente a los tratamientos dietarios observada en el tejido embrionario y decidual. En efecto, deben considerarse los conocidos efectos anti-inflamatorios de la actividad de los tres isotipos de PPARs en diferentes tejidos (Capobianco y col. 2005; Moraes y col. 2006; Martinez y col. 2010).

La síntesis de PGE₂ es regulada positivamente por NO en diversos tejidos reproductivos como el oocito, el embrión y la placenta tanto en ratas controles como con diabetes moderada, sin embargo cuando la diabetes es severa esta regulación se encuentra impedida (Novaro y col. 1996; Gonzalez y col. 1998; Jawerbaum y col. 1998; Jawerbaum y col. 2001). En este trabajo observamos que a pesar de los bajos niveles de PGE₂ embrionarios observados, la producción de NO se encuentra incrementada en los embriones de rata diabética. PPAR δ presente en el embrión en este estadio embrionario, regula genes relacionados con el control anti-inflamatorio en diversos tejidos (Coll y col. 2010). Se conoce que agonistas farmacológicos

de este receptor disminuyen la expresión de iNOS en corazones de ratones a los que se les indujo un shock séptico (Kapoor y col. 2010), y en relación a esto, en este trabajo observamos que agonistas de PPAR δ administrados en la dieta materna logran disminuir la sobreproducción de NO en los embriones de rata diabética.

En la decidua, la dieta enriquecida en aceite de oliva es la más efectiva en disminuir la producción de NO incrementada por la diabetes. Por ello en este caso, la activación de PPARs no pareciera ser la vía principal para la regulación de la síntesis de NO, es sabido que el aceite de oliva contiene polifenoles que son componentes antioxidantes (Faine y col. 2006) que podrían actuar regulando los niveles de NO.

Nuestros resultados muestran que en los embriones el tratamiento materno con ácido fólico no modifica la producción de NO aunque podrían evitar el daño embrionario inducido por el exceso de NO, ya que se ha observado que el ácido fólico previene los defectos de tubo neural inducido por exceso de NO en embriones en pollo en cultivo supliendo el déficit de tetrahidrofolato que induce la inhibición de la metionina sintasa por el NO (Weil y col. 2004) y previene de la apoptosis durante el desarrollo del tubo neural inducida por altos niveles de NO (Plachta y col. 2003).

Además, los tratamientos con ácido fólico solo o en conjunto con la dieta rica en ácido linoleico son altamente efectivos en disminuir la sobreproducción de NO en la decidua de rata diabética. Se sabe que el desacoplamiento de la eNOS provocado por oxidación del cofactor BH₄ por estrés oxidativo induce la producción de O⁻ a instancias de NO, y que el ácido fólico disminuye dicho desacoplamiento restableciendo la biodisponibilidad de BH₄ (Moens y col. 2008), sin embargo poco se sabe de la regulación del ácido fólico sobre la iNOS, enzima cuya expresión se encuentra incrementada en varios órganos de ratas diabéticas inducidas por streptozotocina (Stadler y col. 2008).

En las ratas diabéticas, junto al incremento en la producción de NO, observamos un incremento de otros agentes pro-inflamatorios. La peroxidación lipídica es un índice del estado oxidativo y de forma contraria a lo esperado, observamos que los tratamientos dietarios incrementan la peroxidación de los lípidos de los embriones de ratas controles, esto podría deberse a una mayor afluencia de ácidos grasos insaturados que conduce a una mayor disponibilidad de lípidos susceptibles a ser oxidados. Este

incremento de la peroxidación lipídica no parece afectar el normal desarrollo embrionario en el animal sano ya que en el mismo no se observan diferencias ni en los parámetros de crecimiento y desarrollo embrionario ni en la tasa de reabsorción y malformación con los tratamientos dietarios, por lo que postulamos la existencia de mecanismos compensatorios quizás brindados por la propia activación de PPARs. En forma importante, el suplemento de la dieta con aceite de oliva logra disminuir la peroxidación lipídica en los embriones de ratas diabéticas. Como se mencionó anteriormente, la presencia de agentes antioxidantes como los polifenoles en el aceite de oliva podrían ser los responsables de este efecto (Faine y col. 2006).

En el tejido decidua observamos que los tratamientos dietarios no modifican la peroxidación lipídica en la decidua de rata sana y que tanto el tratamiento con aceite de oliva como con aceite de cártamo logran disminuir los altos niveles de peroxidación lipídica observada en las deciduas de ratas diabéticas. Recordando que en el embrión en organogénesis sólo se expresa PPAR δ , la activación de PPAR γ y PPAR α en la decidua podría ser responsable de los efectos antioxidantes observados en la decidua de rata diabética.

El tratamiento con ácido fólico es capaz de reducir los niveles incrementados de lipoperóxidos en los embriones de ratas diabéticas e incluso también disminuye dichos niveles en el embrión de rata control. Es interesante que mientras que la peroxidación lipídica se incrementaba en el embrión al tratar a los animales controles con la dieta enriquecida con el aceite de cártamo, con el tratamiento conjunto de ácido fólico con la dieta suplementada con el aceite de cártamo no observamos este incremento en los embriones de ratas controles, indicándonos que el ácido fólico tendría propiedades antioxidantes. En efecto, los productos del metabolismo del ácido fólico, el tetrahidrofolato y el 5-methyltetrahidrofolato reducen la peroxidación lipídica *in vitro* en microsomas aislados de hígado de rata (Rezk y col. 2003) y este efecto parece ser mediado por la captación de los peroxinitritos del medio (Antoniades y col. 2006).

De manera similar, en la decidua, la lipoperoxidación lipídica incrementada por la diabetes, se ve reducida con ambos tratamientos con folatos, inclusive se observa que la administración de ácido fólico junto a la dieta suplementada con aceite de cártamo, disminuye también la

peroxidación lipídica en la decidua de ratas controles. Estos hallazgos nos demuestran que el ácido fólico constituye un tratamiento eficaz para reducir la oxidación lipídica incrementada por la diabetes materna, lo cual posiblemente contribuya a sus claros efectos benéficos reportados en este período gestacional (Wentzel y col. 2005).

Dada la capacidad de los tratamientos dietarios con aceites enriquecidos en ácido oleico y linoleico y del ácido fólico de regular la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, agentes activadores de las MMPs (Pustovrh y col. 2005; Pustovrh y col. 2007), quisimos estudiar el efecto de dichos tratamientos sobre la actividad de estas importantes enzimas involucradas en la remodelación tisular.

Hemos observado que los tratamientos con los aceites de oliva y cártamo son efectivos moduladores de la actividad de las MMPs. En efecto, son capaces de reducir la sobreactivación de la MMP9, proMMP2 y MMP2 en los embriones de rata diabética. Inclusive en el embrión de rata sana, se observó con el tratamiento de aceite de oliva una disminución de la actividad de la proMMP2, y con los tratamientos con aceite de oliva y cártamo una reducción de la actividad de la MMP2.

Dada la conocida capacidad de MMPs de ser reguladas en relación al estado rédox (Gu y col. 2002; Pustovrh y col. 2002; Jian Liu y Rosenberg 2005), y de agonistas de PPARs de reducir tanto el estrés oxidativo como nitrativo (Jawerbaum y Capobianco 2010), es posible que los tratamientos dietarios efectuados, mediante la activación de PPARs y regulando vías como la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno modulen la activación de las MMPs. Se ha observado que agonistas de PPARy inducen una reducción en la actividad y expresión de las MMPs en las células del músculo liso vascular y células del epitelio bronquial (Marx y col. 1998; Hetzel y col. 2003) y se indagó sobre el mecanismo de acción involucrado que podría ser mediante la transrepresión de factores de transcripción como AP-1 y NFkB ejercida por los PPARs, y que resulta en la inhibición de la expresión de MMPs (Ricote y Glass 2007). Dado el importante rol que poseen las MMPs durante el desarrollo (Vu y Werb 2000), es probable que la reducción de esta aberrante sobreactivación de MMPs en los embriones de rata diabética sea uno de los mecanismos por los que los activadores de PPARs logran una reducción en la tasa de malformaciones embrionaria.

Cuando evaluamos el efecto de la administración de ácido fólico sobre la actividad de las MMPs, observamos que el tratamiento con el ácido fólico junto a la dieta suplementada con aceite de cártamo reduce la sobreactividad tanto de la MMP9 como de la MMP2 observada en los embriones de rata diabética. Este efecto posiblemente se deba a la acción de la activación de PPARs mediante el ácido linoleico presente en el aceite de cártamo, dado que el mismo efecto se observa con la administración de la dieta enriquecida en aceite de cártamo solo y no se observa al administrar el ácido fólico solo.

También en la decidua, las MMPs tienen un rol fundamental, Wang y colaboradores han demostrado que PPAR δ es requerido para que sea normal el proceso de angiogénesis que ocurre durante el desarrollo de la decidua mesometrial. En efecto, la ausencia de PPAR δ genera un incremento de los niveles de expresión de VEGF, COX-2 y MMP2 lo que conduciría a un proceso de angiogénesis alterado (Wang y col. 2007). Esto nos sugiere que la disminución en la expresión de PPAR δ se encontraría involucrada en el incremento de la expresión de la proMMP2 en las deciduas de rata diabética. A diferencia de lo que ocurre a nivel embrionario, en la decidua la actividad de la MMP2 en sus formas activa y latente no es modulada por los tratamientos dietarios, sin embargo, los tratamientos con agonistas de PPARs disminuyen la actividad de la MMP9 que se encontraba incrementada en la decidua de rata diabética. Dado que el tratamiento con aceite de oliva disminuyó los niveles tanto de NO como de lipoperoxidación lipídica y el tratamiento con cártamo disminuyó la lipoperoxidación lipídica, probablemente en parte sea la reducción del estrés oxidativo y nitrativo la vía por la cual los tratamientos dietarios estén modulando la actividad de MMP9.

El tratamiento conjunto de ácido fólico con la dieta rica en aceite de cártamo disminuyeron la sobreactivación de la MMP9 en la decidua de rata diabética, mientras que el tratamiento con ácido fólico solo no tiene efecto, indicando que, tal como lo observado al estudiar el embrión, el efecto se debería a la activación de PPARs por el ácido linoleico presente en el aceite de cártamo. Por otro lado, mientras que ni con la administración de la dieta rica en aceite de cártamo sola, ni con la administración de folato solo se logra modificar la incrementada actividad de la proMMP2 en la decidua de rata diabética, este efecto sí se logra con el tratamiento conjunto de ácido

fólico con la dieta rica en aceite de cártamo, demostrando en este caso la existencia de un efecto sinérgico entre ambos tratamientos.

En relación a los inhibidores tisulares de las MMPs, la incrementada actividad inhibitoria de TIMP1 y TIMP2 en el embrión de rata diabética se incrementa aún más con los tratamientos enriquecidos en aceite de oliva y cártamo. Si bien aún se conoce poco acerca de la regulación de TIMPs mediada por PPAR δ , se descubrió que agonistas de este receptor nuclear disminuyen la expresión de TIMP1 incrementada por TGF- β 1 en condrocitos en cultivo (Poleni y col. 2010) y aumenta la expresión de TIMP3 en células del músculo liso vascular en cultivo (Kim y col. 2009).

En cuanto a otros isotipos de PPARs, se ha observado que agonistas de PPAR γ incrementan los niveles de expresión de TIMP1 en células de cáncer de colon humano (Shen y col. 2007) y de TIMP3 en placentas de ratas diabéticas a mediados de la gestación (Pustovrh y col. 2009). En la decidua también hemos observado que los tratamientos con agonistas de PPARs incrementan la actividad de los TIMPs en tejido decidual de rata sana y diabética.

Al estudiar la decidua de rata observamos que ninguno de los tratamientos con folatos modificó la actividad de los TIMPs. Además, observamos que la actividad de TIMP1 y TIMP2 se incrementa en el embrión que proviene de rata diabética con el tratamiento con ácido fólico solo, observándose también el incremento de TIMP1 cuando el ácido fólico se administra en conjunto con la suplementación de la dieta con aceite de cártamo. Los cambios importantes observados en el embrión ante el tratamiento con folato son acordes a la relevancia que tiene en el embrión la suplementación materna con ácido fólico. En efecto, el déficit de este compuesto puede llevar a alteraciones en la expresión de ciertos genes embrionarios por modificaciones en la metilación del ADN (Pozharny y col. 2010). La adición del grupo metilo se realiza en las citosinas que forman parte de las islas CpG presentes en el promotor de ciertos genes. La fertilización, gametogénesis y desarrollo embrionario temprano son los eventos más susceptibles a influencias epigenéticas.

Muchos genes poseen islas CpG susceptibles de ser metiladas, en el hígado de la descendencia de ratas alimentadas con dietas deficientes en proteínas se observó una disminución en la metilación en el gen de PPAR α

que correlaciona con un incremento en la expresión del mismo y esta alteración es revertida suplementando la dieta materna con ácido fólico (Lillicrop y col. 2005). Pero no sólo las células embrionarias son susceptibles a cambios epigenéticos, las células tumorales también poseen este tipo de regulación. Un trabajo reciente nos muestra que en una línea celular de cáncer de mama donde la expresión de la MMP2 se encontraba disminuida, existía hipermetilación de las islas CpG del gen de la MMP2, mientras que en líneas celulares tumorales donde este gen se encuentra hipometilado, su expresión se encuentra incrementada (Chernov y col. 2009). De forma interesante, el gen de TIMP2 se expresa en todas las líneas celulares de tumores inclusive en la de cáncer de mama mencionada anteriormente y se encontraron en dicho gen dos islas CpG diferentes, una de las mismas se encontraba hipermetilada (Chernov y col. 2009). Es decir, que el patrón de metilación varía de acuerdo al tipo celular y al gen en cuestión y puede generar tanto una sobreexpresión como una represión génica. Si bien en este estudio no se dosó la expresión de TIMPs, MMPs o PPARs en presencia de folatos, surge el interés de profundizar el estudio del posible efecto del ácido fólico sobre la expresión de dichos genes.

En este trabajo observamos el efecto regulador de los tratamientos con ácido fólico y aceite de cártamo sobre los TIMPs embrionarios y es por esto que fue de interés estudiar la interacción que existe entre las MMPs y los TIMPs y la localización de los mismos en el tejido embrionario y decidual.

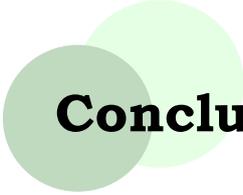
Resultados de la zimografía *in situ* nos indican que la actividad incrementada MMPs se encuentra débilmente inhibida por los TIMPs en el embrión de rata diabética, a pesar de que la actividad inhibitoria de los TIMPs se encuentra incrementada en estos tejidos. En forma interesante, se observa una disminución de la proporción MMPs/TIMPs en el embrión de rata diabética tratada con ácido fólico solo y una fuerte disminución con el tratamiento conjunto de ácido fólico junto a la dieta rica en aceite de cártamo obteniéndose en este último caso valores similares al control. Dado que nuestros resultados muestran que el tratamiento con folato incrementa la actividad de TIMPs, mientras que el tratamiento conjunto disminuye la actividad de las MMPs e incrementa la actividad de TIMP1, el resultado de la zimografía *in situ* nos indica que el incremento en la actividad de TIMPs sería suficiente para mejorar el balance entre las MMPs y los TIMPs pero

que es necesario el tratamiento conjunto para una reversión a valores similares al control.

En la decidua de rata diabética, también observamos un incremento en la proporción MMPs/TIMPs que se revierte con el tratamiento conjunto con ácido fólico y la dieta rica en aceite de cártamo. Estos hallazgos nos indican que la reducción en la actividad de las MMPs deciduales observado al someter a las ratas a este tratamiento conjunto, es eficaz a pesar de que el mismo no modifica la actividad de los TIMPs.

Estos resultados nos muestran un claro efecto benéfico del tratamiento materno conjunto de ácido fólico con una dieta rica en aceite de cártamo sobre el balance MMPs/TIMPs, que podría estar relacionado con la disminución en la tasa de malformaciones embrionarias observada en los embriones provenientes de ratas diabéticas y que posiblemente contribuya también a mejorar el posterior desarrollo feto-placentario.

En conjunto, al abordar el estudio de la organogénesis temprana en modelos experimentales de diabetes identificamos aberrantes caminos de señalización intracelular y un entorno de tipo pro-inflamatorio en el embrión y la decidua que lo rodea. El hecho de haber identificado tratamientos capaces de reducir los índices de reabsorción y malformación embrionaria y a su vez regular vías de señalización intracelular, reducir el impacto del estrés oxidativo y nitrativo y prevenir anomalías en la remodelación de la matriz extracelular, nos permite destacar a los tratamientos enriquecidos en aceites de oliva y cártamo (capaces de activar PPARs) y con folatos como eficaces reguladores del daño inducido por la diabetes materna y plausibles de ser aplicados a la gestación humana.



Conclusiones

El mayor índice de malformaciones congénitas en los hijos de madres diabéticas prevalece a pesar de un estricto control metabólico a través de la dieta y de la administración de insulina materna. En este trabajo se estudiaron probables vías de inducción de malformaciones embrionarias en un modelo de diabetes experimental y se evaluaron tratamientos plausibles de ser administrados a embarazadas diabéticas para prevenir dichas malformaciones. El primer tratamiento utilizado consistió en la administración de dietas enriquecidas en ácidos grasos insaturados capaces de activar PPARs. Los PPARs son factores de transcripción que participan en diferentes procesos como la diferenciación y proliferación celular y la homeostasis lipídica y han sido ampliamente estudiados para el tratamiento de la diabetes ya que se encuentran involucrados en el control de la insulino resistencia y de procesos proinflamatorios. En segundo lugar, se evaluó el tratamiento materno con ácido fólico, conociéndose la capacidad de los folatos de prevenir la inducción de malformaciones congénitas, pero sin conocerse en profundidad sus mecanismos de acción. Por último, se ha analizado el tratamiento conjunto de la administración de aceite de cártamo, ácido poliinsaturado y activador de PPARs y el tratamiento con ácido fólico.

Este estudio fue llevado a cabo en embriones y deciduas de ratas sanas y diabéticas explantados en etapa de organogénesis temprana, periodo de alta susceptibilidad para la inducción de malformaciones embrionarias.

Nuestros resultados muestran que la diabetes materna:

- ▶ Induce alteraciones en el crecimiento y desarrollo embrionario, observándose incrementos en la tasa de reabsorción y malformación embrionaria.
- ▶ Reduce la expresión del receptor nuclear PPAR δ tanto en el embrión como en la decidua diabética, siendo esta isoforma del receptor particularmente importante durante el proceso de implantación embrionaria y la formación de la placenta, y el único isotipo de PPAR presente en el embrión durante la organogénesis temprana.
- ▶ Altera los niveles de PGI₂ y PGE₂, importantes morfógenos derivados del ácido araquidónico, tanto en el embrión como en la decidua de rata diabética, conduciendo a un déficit de estos morfógenos durante la organogénesis, y ejerciendo propiedades pro-inflamatorias a nivel decidual.
- ▶ Genera un entorno pro-inflamatorio que se evidencia en la sobreproducción de óxido nítrico y en incrementos en índices de estrés oxidativo tanto a nivel embrionario como decidual.
- ▶ El incremento en especies reactivas del oxígeno y la sobreproducción de NO conducen a la producción de peroxinitritos, potentes oxidantes, evidenciándose la acción dañina de los mismos sobre el embrión y la decidua.
- ▶ Incrementa la actividad y expresión de las MMPs, y genera cambios compensatorios en la actividad de sus inhibidores endógenos, los TIMPs en el tejido embrionario y decidual de rata. En esta etapa del desarrollo embrionario, tanto el embrión como la decidua que lo rodea se encuentran sufriendo activos procesos de remodelación y reestructuración tisular. Las alteraciones inducidas por la diabetes en la homeostasis de la matriz extracelular afectan su remodelación en forma apropiada y acorde al estadio de desarrollo.

Estos resultados, en conjunto con las dificultades en prevenir el daño inducido por la hiperglucemia en la gestante diabética, ponen de manifiesto la necesidad de identificar tratamientos que puedan mejorar el desarrollo del embrión en la etapa de organogénesis temprana.

Nuestros resultados evidencian que los tratamientos dietarios con ácidos grasos mono y poliinsaturados en la rata diabética gestante:

- Revierten parcialmente las alteraciones en el crecimiento y desarrollo embrionario y disminuyen la incrementada tasa de reabsorciones y malformaciones embrionarias en las ratas diabéticas.
- Mejoran el perfil de prostanoïdes como PGI₂ y PGE₂ embrionario y decidual, cuyos niveles alterados se encuentran involucrados en la embriopatía diabética.
- Disminuyen el impacto del estrés oxidativo y nitrativo en el embrión y la decidua reduciendo de esta manera el daño oxidativo que genera la hiperglucemia en el embrión y la decidua.
- Reducen la sobreactivación de las MMPs embrionarias e incrementan la actividad inhibitoria de los TIMPs, destacándose la relevancia del control de la actividad de estas enzimas, poco estudiadas en forma previa en esta etapa del desarrollo, y cuyas anomalías se encuentran posiblemente implicadas en la inducción de dismorfogénesis embrionaria y en las alteraciones en la formación placentaria características de la gestación diabética.

Nuestros resultados muestran que los tratamientos con ácido fólico, y con ácido fólico administrado en conjunto con una dieta rica en aceite de cártamo a la rata diabética gestante:

- Son capaces de reducir la incrementada tasa de reabsorción y malformación embrionaria, siendo el tratamiento conjunto de folato con la dieta rica en ácidos poliinsaturados capaz de lograr una reversión total de las malformaciones embrionarias inducidas en este modelo experimental.
- Reducen la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno en la decidua reduciendo el entorno pro-inflamatorio en el que se desarrolla el embrión, observándose en los embriones de ratas diabéticas bajo dichos tratamientos una reducción en la lipoperoxidación lipídica.

► Contribuyen a incrementar la actividad inhibitoria de los TIMPs y previenen el desbalance MMPs/TIMPs en el embrión de rata diabética, siendo el tratamiento conjunto de folato con la dieta rica en aceite de cártamo eficaz en la reducción de la sobreactivación de las MMPs embrionarias y deciduales, ayudando de esta manera a normalizar el proceso de remodelación tisular que se ejerce en estos tejidos durante el período de organogénesis temprana.

En base a lo presentado en este trabajo de tesis podemos identificar aberrantes caminos de señalización intracelular, un entorno de tipo pro-inflamatorio y anomalías en la remodelación tisular en el embrión y la decidua de rata diabética. El estudio de los mecanismos de acción de la activación de los PPARs y del ácido fólico prueba que existe la posibilidad de lograr una disminución de las malformaciones embrionarias de forma independiente de la glucemia materna, constituyendo posibles complementos al tratamiento insulínico o al control metabólico en el tratamiento de la diabetes a fin de lograr un embarazo exitoso.



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): 246-57.
- Abbott, B. D., C. R. Wood, A. M. Watkins, K. P. Das and C. S. Lau (2010). "**Peroxisome proliferator-activated receptors alpha, Beta, and gamma mRNA and protein expression in human fetal tissues.**" *PPAR Res* 2010.
- Abrahamsohn, P. A. and T. M. Zorn (1993). "**Implantation and decidualization in rodents.**" *J Exp Zool* 266(6): 603-28.
- Abrahamsohn, P. Z. T. O. S. (2002). "**Decidua in rodents. En: The endometrium. p 279-293.**" *Eds Glasser, Aplin, Giudice and Tabibzadeh. Taylor and Francis, London.*
- Abrams, S. E., K. P. Walsh, S. J. Coker and M. J. Clarkson (1995). "**Responses of the post-term arterial duct to oxygen, prostaglandin E2, and the nitric oxide donor, 3-morpholiniosydnonimine, in lambs and their clinical implications.**" *Br Heart J* 73(2): 177-81.
- Ackerman, W. E. t., X. L. Zhang, B. H. Rovin and D. A. Kniss (2005). "**Modulation of cytokine-induced cyclooxygenase 2 expression by PPARG ligands through NFkappaB signal disruption in human WISH and amnion cells.**" *Biol Reprod* 73(3): 527-35.
- Adibhatla, R. M. and J. F. Hatcher (2008). "**Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies.**" *BMB Rep* 41(8): 560-7.
- Aerts, L. and F. A. Van Assche (2003). "**Intra-uterine transmission of disease.**" *Placenta* 24(10): 905-11.
- Ahmed, A. and J. Perkins (2000). "**Angiogenesis and intrauterine growth restriction.**" *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 14(6): 981-98.
- Ahonen, M., M. Poukkula, A. H. Baker, M. Kashiwagi, H. Nagase, J. E. Eriksson and V. M. Kahari (2003). "**Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors.**" *Oncogene* 22(14): 2121-34.
- Ahrenstedt, O., R. Hallgren and L. Knutson (1994). "**Jejunal release of prostaglandin E2 in Crohn's disease: relation to disease activity and first-degree relatives.**" *J Gastroenterol Hepatol* 9(6): 539-43.
- Alexander, B. (1998). "**The role of nitric oxide in hepatic metabolism.**" *Nutrition* 14(4): 376-90.
- Alexander, C. M., E. J. Hansell, O. Behrendtsen, M. L. Flannery, N. S. Kishnani, S. P. Hawkes and Z. Werb (1996). "**Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation.**" *Development* 122(6): 1723-36.
- Amour, A., P. M. Slocombe, A. Webster, M. Butler, C. G. Knight, B. J. Smith, P. E. Stephens, C. Shelley, M. Hutton, V. Knauper, A. J. Docherty and G. Murphy (1998). "**TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3.**" *FEBS Lett* 435(1): 39-44.
- Antoniades, C., C. Shirodaria, N. Warrick, S. Cai, J. de Bono, J. Lee, P. Leeson, S. Neubauer, C. Ratnatunga, R. Pillai, H. Refsum and K. M. Channon (2006). "**5-methyltetrahydrofolate rapidly improves endothelial function and decreases superoxide production in human vessels: effects on vascular tetrahydrobiopterin availability and endothelial nitric oxide synthase coupling.**" *Circulation* 114(11): 1193-201.
- Apte, S. S., K. Hayashi, M. F. Seldin, M. G. Mattei, M. Hayashi and B. R. Olsen (1994). "**Gene encoding a novel murine tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP), TIMP-3, is expressed in developing mouse epithelia, cartilage, and muscle, and is located on mouse chromosome 10.**" *Dev Dyn* 200(3): 177-97.
- Arnaiz, S. L., G. D'Amico, N. Paglia, M. Arismendi, N. Basso and M. del Rosario Lores Arnaiz (2004). "**Enriched environment, nitric oxide production and synaptic plasticity prevent the aging-dependent impairment of spatial cognition.**" *Mol Aspects Med* 25(1-2): 91-101.

- Arthur, M. J. (2000). "**Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis.**" *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279(2): G245-9.
- Ayalasomayajula, S. P., A. C. Amrite and U. B. Kompella (2004). "**Inhibition of cyclooxygenase-2, but not cyclooxygenase-1, reduces prostaglandin E2 secretion from diabetic rat retinas.**" *Eur J Pharmacol* 498(1-3): 275-8.
- Bagi, Z., N. Erdei, Z. Papp, I. Edes and A. Koller (2006). "**Up-regulation of vascular cyclooxygenase-2 in diabetes mellitus.**" *Pharmacol Rep* 58 Suppl: 52-6.
- Bailey, L. B. and J. F. Gregory, 3rd (1999). "**Folate metabolism and requirements.**" *J Nutr* 129(4): 779-82.
- Baka, S., K. Zourla, E. Kouskouni, E. Makrakis, S. Demeridou, D. Tzanakaki, D. Hassiakos and G. Creatsas (2010). "**Matrix metalloproteinases 2 and 9 and their tissue inhibitors in the follicular fluid of patients with polycystic ovaries undergoing in vitro fertilisation.**" *In Vivo* 24(3): 293-6.
- Baker, A. H., D. R. Edwards and G. Murphy (2002). "**Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities.**" *J Cell Sci* 115(Pt 19): 3719-27.
- Baker, A. H., S. J. George, A. B. Zaltsman, G. Murphy and A. C. Newby (1999). "**Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3.**" *Br J Cancer* 79(9-10): 1347-55.
- Baker, A. H., A. B. Zaltsman, S. J. George and A. C. Newby (1998). "**Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis.**" *J Clin Invest* 101(6): 1478-87.
- Baker, L., R. Piddington, A. Goldman, J. Egler and J. Moehring (1990). "**Myo-inositol and prostaglandins reverse the glucose inhibition of neural tube fusion in cultured mouse embryos.**" *Diabetologia* 33(10): 593-6.
- Balligand, J. L., L. Kobzik, X. Han, D. M. Kaye, L. Belhassen, D. S. O'Hara, R. A. Kelly, T. W. Smith and T. Michel (1995). "**Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes.**" *J Biol Chem* 270(24): 14582-6.
- Banner, C. D., M. Gottlicher, E. Widmark, J. Sjoval, J. J. Rafter and J. A. Gustafsson (1993). "**A systematic analytical chemistry/ cell assay approach to isolate activators of orphan nuclear receptors from biological extracts: characterization of peroxisome proliferator-activated receptor activators in plasma.**" *J Lipid Res* 34(9): 1583-91.
- Barak, Y., D. Liao, W. He, E. S. Ong, M. C. Nelson, J. M. Olefsky, R. Boland and 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 and 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 and T. Shalom-Barak (2008). "**PPAR Signaling in Placental Development and Function.**" *PPAR Res* 2008: 142082.
- Barbour, L. A., C. E. McCurdy, T. L. Hernandez, J. P. Kirwan, P. M. Catalano and J. E. Friedman (2007). "**Cellular mechanisms for insulin resistance in normal pregnancy and gestational diabetes.**" *Diabetes Care* 30 Suppl 2: S112-9.
- Barrett, A. J. (1981). "**Alpha 2-macroglobulin.**" *Methods Enzymol* 80 Pt C: 737-54.
- Baskar, J. F., D. F. Torchiana, J. D. Biggers, E. J. Corey, N. H. Andersen and N. Subramanian (1981). "**Inhibition of hatching of mouse blastocysts in vitro by various prostaglandin antagonists.**" *J Reprod Fertil* 63(2): 359-63.
- Beaven, S. W. and P. Tontonoz (2006). "**NUCLEAR RECEPTORS IN LIPID METABOLISM: Targeting the Heart of Dyslipidemia.**" *Annu Rev Med* 57: 313-329.
- Beckman, J. S. and W. H. Koppenol (1996). "**Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.**" *Am J Physiol* 271(5 Pt 1): C1424-37.
- Behrendtsen, O. and Z. Werb (1997). "**Metalloproteinases regulate parietal endoderm differentiating and migrating in cultured mouse embryos.**" *Dev Dyn* 208(2): 255-65.
- Berger, J. and D. E. Moller (2002). "**The mechanisms of action of PPARs.**" *Annu Rev Med* 53: 409-35.
- Berry, E. B., R. Eykholt, R. J. Helliwell, R. S. Gilmour, M. D. Mitchell and 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.
- Berry, E. B., J. A. Keelan, R. J. Helliwell, R. S. Gilmour and M. D. Mitchell (2005). "**Nanomolar and micromolar effects of 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 on amnion-derived WISH epithelial cells: differential roles of peroxisome proliferator-activated receptors gamma and delta and nuclear factor kappa B.**" *Mol Pharmacol* 68(1): 169-78.
- Bertaux, B., W. Hornebeck, A. Z. Eisen and L. Dubertret (1991). "**Growth stimulation of human keratinocytes by tissue inhibitor of metalloproteinases.**" *J Invest Dermatol* 97(4): 679-85.
- Bhatt, L. K. and V. Addepalli "**Attenuation of diabetic retinopathy by enhanced inhibition of MMP-2 and MMP-9 using aspirin and minocycline in streptozotocin-diabetic rats.**" *Am J Transl Res* 2(2): 181-9.

- Bhattacharya, M., K. G. Peri, G. Almazan, A. Ribeiro-da-Silva, H. Shichi, Y. Durocher, M. Abramovitz, X. Hou, D. R. Varma and S. Chemtob (1998). "**Nuclear localization of prostaglandin E2 receptors.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26): 15792-7.
- Bian, J., Y. Wang, M. R. Smith, H. Kim, C. Jacobs, J. Jackman, H. F. Kung, N. H. Colburn and Y. Sun (1996). "**Suppression of in vivo tumor growth and induction of suspension cell death by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3.**" *Carcinogenesis* 17(9): 1805-11.
- Bigg, H. F., C. J. Morrison, G. S. Butler, M. A. Bogoyevitch, Z. Wang, P. D. Soloway and C. M. Overall (2001). "**Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase.**" *Cancer Res* 61(9): 3610-8.
- Bigg, H. F., Y. E. Shi, Y. E. Liu, B. Steffensen and C. M. Overall (1997). "**Specific, high affinity binding of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) to the COOH-terminal hemopexin-like domain of human gelatinase A. TIMP-4 binds progelatinase A and the COOH-terminal domain in a similar manner to TIMP-2.**" *J Biol Chem* 272(24): 15496-500.
- Bindoli, A., J. M. Fukuto and H. J. Forman (2008). "**Thiol chemistry in peroxidase catalysis and redox signaling.**" *Antioxid Redox Signal* 10(9): 1549-64.
- Blankenship, J. W., R. Jenks, A. M. MacMurray, L. B. Sandberg and R. J. Boucek (1989). "**Uniqueness of dietary olive oil in stimulating aortic prostacyclin production in post-weanling rats.**" *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 36(1): 31-4.
- Blankenship, T. N., R. L. Given and T. A. Parkening (1990). "**Blastocyst implantation in the Chinese hamster (Cricetulus griseus).**" *Am J Anat* 187(2): 137-57.
- Blankenship, T. N. and B. F. King (1994). "**Identification of 72-kilodalton type IV collagenase at sites of trophoblastic invasion of macaque spiral arteries.**" *Placenta* 15(2): 177-87.
- Blanquart, C., O. Barbier, J. C. Fruchart, B. Staels and 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.
- Blanquart, C., O. Barbier, J. C. Fruchart, B. Staels and C. Glineur (2003). "**Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation.**" *J Steroid Biochem Mol Biol* 85(2-5): 267-73.
- Blavier, L. and J. M. Delaisse (1995). "**Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones.**" *J Cell Sci* 108 (Pt 12): 3649-59.
- Bloch, W., B. K. Fleischmann, D. E. Lorke, C. Andressen, B. Hops, J. Hescheler and K. Addicks (1999). "**Nitric oxide synthase expression and role during cardiomyogenesis.**" *Cardiovasc Res* 43(3): 675-84.
- Bode, W. and K. Maskos (2001). "**Structural studies on MMPs and TIMPs.**" *Methods Mol Biol* 151: 45-77.
- Bonadonna, R. C. and R. A. De Fronzo (1991). "**Glucose metabolism in obesity and type 2 diabetes.**" *Diabete Metab* 17(1 Pt 2): 112-35.
- Bord, S., A. Horner, C. A. Beeton, R. M. Hembry and J. E. Compston (1999). "**Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) distribution in normal and pathological human bone.**" *Bone* 24(3): 229-35.
- Bordoni, A., M. Di Nunzio, F. Danesi and P. L. Biagi (2006). "**Polyunsaturated fatty acids: From diet to binding to ppars and other nuclear receptors.**" *Genes Nutr* 1(2): 95-106.
- Boujrad, N., S. O. Ogwuegbu, M. Garnier, C. H. Lee, B. M. Martin and V. Papadopoulos (1995). "**Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis.**" *Science* 268(5217): 1609-12.
- Boveris, A., S. F. Llesuy and C. G. Fraga (1985). "**Increased liver chemiluminescence in tumor-bearing mice.**" *J Free Radic Biol Med* 1(2): 131-8.
- 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.
- Braissant, O., F. Foufelle, C. Scotto, M. Dauca and W. Wahli (1996). "**Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat.**" *Endocrinology* 137(1): 354-66.
- Braissant, O. and W. Wahli (1998). "**Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma during rat embryonic development.**" *Endocrinology* 139(6): 2748-54.
- Bredt, D. S., C. D. Ferris and S. H. Snyder (1992). "**Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites.**" *J Biol Chem* 267(16): 10976-81.
- Bredt, D. S., P. M. Hwang and S. H. Snyder (1990). "**Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide.**" *Nature* 347(6295): 768-70.
- Brelje, T. C., D. W. Scharp, P. E. Lacy, L. Ogren, F. Talamantes, M. Robertson, H. G. Friesen and R. L. Sorenson (1993). "**Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human**

- islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy." *Endocrinology* 132(2): 879-87.
- Brenner, C. A., R. R. Adler, D. A. Rappolee, R. A. Pedersen and Z. Werb (1989). "**Genes for extracellular-matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development.**" *Genes Dev* 3(6): 848-59.
- Brew, K. and H. Nagase (2010). "**The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity.**" *Biochim Biophys Acta* 1803(1): 55-71.
- Brillon, D. J., G. R. Freidenberg, R. R. Henry and J. M. Olefsky (1989). "**Mechanism of defective insulin-receptor kinase activity in NIDDM. Evidence for two receptor populations.**" *Diabetes* 38(3): 397-403.
- Brown, D. L., M. S. Hibbs, M. Kearney, C. Loushin and J. M. Isner (1995). "**Identification of 92-kD gelatinase in human coronary atherosclerotic lesions. Association of active enzyme synthesis with unstable angina.**" *Circulation* 91(8): 2125-31.
- Brown, N. (1991). "**Routine assessment of morphology and growth: Scoring systems and measurements of size.**" *En: Postimplantation mammalian embryos. A practical approach. Editores: Copp, AJ; Cockroft, DL.* 5: 93-108.
- Brownlee, M. (2001). "**Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.**" *Nature* 414(6865): 813-20.
- Bucala, R., K. J. Tracey and A. Cerami (1991). "**Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes.**" *J Clin Invest* 87(2): 432-8.
- Buch, I., P. J. Hornnes and C. Kuhl (1986). "**Glucose tolerance in early pregnancy.**" *Acta Endocrinol (Copenh)* 112(2): 263-6.
- Buchanan, T. A., K. M. Denno, G. F. Sipos and T. W. Sadler (1994). "**Diabetic teratogenesis. In vitro evidence for a multifactorial etiology with little contribution from glucose per se.**" *Diabetes* 43(5): 656-60.
- Buhimschi, I., M. Ali, V. Jain, K. Chwalisz and R. E. Garfield (1996). "**Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour.**" *Hum Reprod* 11(8): 1755-66.
- Bullen, E. C., M. T. Longaker, D. L. Updike, R. Benton, D. Ladin, Z. Hou and E. W. Howard (1995). "**Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds.**" *J Invest Dermatol* 104(2): 236-40.
- Burdick, A. D., D. J. Kim, M. A. Peraza, F. J. Gonzalez and J. M. Peters (2006). "**The role of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta in epithelial cell growth and differentiation.**" *Cell Signal* 18(1): 9-20.
- Butler, G. S., S. S. Apte, F. Willenbrock and G. Murphy (1999). "**Human tissue inhibitor of metalloproteinases 3 interacts with both the N- and C-terminal domains of gelatinases A and B. Regulation by polyanions.**" *J Biol Chem* 274(16): 10846-51.
- Camus-Bablon, F., R. M. Cohen, M. A. Berk, G. Perisutti, K. Hunter and L. A. Frohman (1990). "**Alterations in circulating human chorionic gonadotropin free alpha-subunit in insulin-dependent diabetic pregnancy: correlation with maternal characteristics.**" *J Clin Endocrinol Metab* 71(1): 46-52.
- Capobianco, E., A. Jawerbaum, M. C. Romanini, V. White, C. Pustovrh, R. Higa, N. Martinez, M. T. Mugnaini, C. Sonez and E. Gonzalez (2005). "**15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARGamma) levels in term placental tissues from control and diabetic rats: modulatory effects of a PPARGamma agonist on nitridergic and lipid placental metabolism.**" *Reprod Fertil Dev* 17(4): 423-433.
- Capobianco, E., N. Martinez, R. Higa, V. White and A. Jawerbaum (2008). "**The effects of maternal dietary treatments with natural PPAR ligands on lipid metabolism in fetuses from control and diabetic rats.**" *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 79(6): 191-199.
- Capobianco, E., V. White, R. Higa, N. Martinez and A. Jawerbaum (2008). "**Effects of natural ligands of PPARGamma on lipid metabolism in placental tissues from healthy and diabetic rats.**" *Mol Hum Reprod* 14(8): 491-9.
- Carlson, M., Ed. (2000). "**Embriología Humana y Biología del Desarrollo**". 2° edición. Ediciones Harcourt S.A.
- Catalano, P. M. and J. P. Kirwan (2001). "**Maternal factors that determine neonatal size and body fat.**" *Curr Diab Rep* 1(1): 71-7.
- Caterina, N. C., L. J. Windsor, M. K. Boddien, A. E. Yermovsky, K. B. Taylor, H. Birkedal-Hansen and J. A. Engler (1998). "**Glycosylation and NH2-terminal domain mutants of the tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1).**" *Biochim Biophys Acta* 1388(1): 21-34.
- Cawston, T. E., D. N. Noble, G. Murphy, A. J. Smith, C. Woodley and B. Hazleman (1986). "**Rapid purification of tissue inhibitor of metalloproteinases from human plasma and identification as a gamma-serum protein.**" *Biochem J* 238(3): 677-82.
- CDC U.S. Department of Health (1992). "**Center for Disease Control. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects.**" *MMWR Recomm Rep* 41(RR-14): 1-7.

- Cederberg, J., S. Basu and U. J. Eriksson (2001). "**Increased rate of lipid peroxidation and protein carbonylation in experimental diabetic pregnancy.**" *Diabetologia* 44(6): 766-74.
- Ceradini, D. J., D. Yao, R. H. Grogan, M. J. Callaghan, D. Edelstein, M. Brownlee and G. C. Gurtner (2008). "**Decreasing intracellular superoxide corrects defective ischemia-induced new vessel formation in diabetic mice.**" *J Biol Chem* 283(16): 10930-8.
- Cetin, I., G. Alvino and M. Cardellicchio (2009). "**Long chain fatty acids and dietary fats in fetal nutrition.**" *J Physiol* 587(Pt 14): 3441-51.
- Cipollone, F., M. Fazio, A. Iezzi, G. Ciabattini, B. Pini, C. Cucurullo, S. Uchino, F. Spigonardo, M. De Luca, C. Prontera, F. Chiarelli, F. Cucurullo and A. Mezzetti (2004). "**Balance between PGD synthase and PGE synthase is a major determinant of atherosclerotic plaque instability in humans.**" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(7): 1259-65.
- Cipollone, F., A. Iezzi, M. Fazio, M. Zucchelli, B. Pini, C. Cucurullo, D. De Cesare, G. De Blasis, R. Muraro, R. Bei, F. Chiarelli, A. M. Schmidt, F. Cucurullo and A. Mezzetti (2003). "**The receptor RAGE as a progression factor amplifying arachidonate-dependent inflammatory and proteolytic response in human atherosclerotic plaques: role of glycemic control.**" *Circulation* 108(9): 1070-7.
- Cipollone, F., C. Prontera, B. Pini, M. Marini, M. Fazio, D. De Cesare, A. Iezzi, S. Uchino, G. Boccoli, V. Saba, F. Chiarelli, F. Cucurullo and A. Mezzetti (2001). "**Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability.**" *Circulation* 104(8): 921-7.
- Clark, I. M., T. E. Swingle, C. L. Sampieri and D. R. Edwards (2008). "**The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors.**" *Int J Biochem Cell Biol* 40(6-7): 1362-78.
- Clyman, R. I., F. Mauray, C. Roman, M. A. Heymann and B. Payne (1983). "**Factors determining the loss of ductus arteriosus responsiveness to prostaglandin E.**" *Circulation* 68(2): 433-6.
- Coleman, R. A., W. L. Smith and S. Narumiya (1994). "**International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes.**" *Pharmacol Rev* 46(2): 205-29.
- Coll, T., E. Barroso, D. Alvarez-Guardia, L. Serrano, L. Salvado, M. Merlos, X. Palomer and M. Vazquez-Carrera (2010). "**The Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor beta/delta on the Inflammatory Basis of Metabolic Disease.**" *PPAR Res* 2010.
- Comi, R. J., G. Grunberger and P. Gorden (1987). "**Relationship of insulin binding and insulin-stimulated tyrosine kinase activity is altered in type II diabetes.**" *J Clin Invest* 79(2): 453-62.
- Cong, J., H. L. Diao, Y. C. Zhao, H. Ni, Y. Q. Yan and Z. M. Yang (2006). "**Differential expression and regulation of cylooxygenases, prostaglandin E synthases and prostacyclin synthase in rat uterus during the peri-implantation period.**" *Reproduction* 131(1): 139-51.
- Conget, I. (2002). "**[Diagnosis, classification and cathogenesis of diabetes mellitus].**" *Rev Esp Cardiol* 55(5): 528-35.
- Conrad, K. P., M. Vill, P. G. McGuire, W. G. Dail and A. K. Davis (1993). "**Expression of nitric oxide synthase by syncytiotrophoblast in human placental villi.**" *Faseb J* 7(13): 1269-76.
- Corcoran, M. L. and W. G. Stetler-Stevenson (1995). "**Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism.**" *J Biol Chem* 270(22): 13453-9.
- Cosentino, F., K. Hishikawa, Z. S. Katusic and T. F. Luscher (1997). "**High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells.**" *Circulation* 96(1): 25-8.
- 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.
- Cousins, L. (1991). "**Insulin sensitivity in pregnancy.**" *Diabetes* 40 Suppl 2: 39-43.
- Crainie, M., L. Guilbert and T. G. Wegmann (1990). "**Expression of novel cytokine transcripts in the murine placenta.**" *Biol Reprod* 43(6): 999-1005.
- Cross, J. C. (1998). "**Formation of the placenta and extraembryonic membranes.**" *Ann N Y Acad Sci* 857: 23-32.
- Cross, J. C., Z. Werb and S. J. Fisher (1994). "**Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle.**" *Science* 266(5190): 1508-18.
- Croy, B. A., L. J. Guilbert, M. A. Browne, N. M. Gough, D. T. Stinchcomb, N. Reed and T. G. Wegmann (1991). "**Characterization of cytokine production by the metrial gland and granulated metrial gland cells.**" *J Reprod Immunol* 19(2): 149-66.
- Croy, B. A., H. He, S. Esadeg, Q. Wei, D. McCartney, J. Zhang, A. Borzychowski, A. A. Ashkar, G. P. Black, S. S. Evans, S. Chantakru, M. van den Heuvel, V. A. Paffaro, Jr. and A. T. Yamada (2003). "**Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modelling.**" *Reproduction* 126(2): 149-60.
- Croze, F., T. G. Kennedy, I. C. Schroedter, H. G. Friesen and L. J. Murphy (1990). "**Expression of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-1 in the rat uterus during decidualization.**" *Endocrinology* 127(4): 1995-2000.
- Chandrasekharan, N. V., H. Dai, K. L. Roos, N. K. Evanson, J. Tomsik, T. S. Elton and D. L. Simmons (2002). "**COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other**

- analgesic/ antipyretic drugs: cloning, structure, and expression.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(21): 13926-31.
- Chen, J., Y. Tu, C. Moon, V. Matarazzo, A. M. Palmer and G. V. Ronnett (2004). **"The localization of neuronal nitric oxide synthase may influence its role in neuronal precursor proliferation and synaptic maintenance."** *Dev Biol* 269(1): 165-82.
- Chen, L., M. Nakai, R. J. Belton, Jr. and R. A. Nowak (2007). **"Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinases during mouse embryonic development."** *Reproduction* 133(2): 405-14.
- Cherney, D. Z., J. W. Scholey and J. A. Miller (2008). **"Insights into the regulation of renal hemodynamic function in diabetic mellitus."** *Curr Diabetes Rev* 4(4): 280-90.
- Chernov, A. V., N. E. Sounni, A. G. Remacle and A. Y. Strongin (2009). **"Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/ MMP-2/ TIMP-2 axis in cancer cells."** *J Biol Chem* 284(19): 12727-34.
- Chi, M. M., A. Hoehn and K. H. Moley (2002). **"Metabolic changes in the glucose-induced apoptotic blastocyst suggest alterations in mitochondrial physiology."** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(2): E226-32.
- Chin, J. R. and Z. Werb (1997). **"Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration and remodeling of epithelium, tongue skeletal muscle and cartilage in the mandibular arch."** *Development* 124(8): 1519-30.
- Chung, A. W., H. H. Yang, M. K. Sigrist, G. Brin, E. Chum, W. A. Gourlay and A. Levin (2009). **"Matrix metalloproteinase-2 and -9 exacerbate arterial stiffening and angiogenesis in diabetes and chronic kidney disease."** *Cardiovasc Res* 84(3): 494-504.
- da Costa, M., J. M. Sequeira, S. P. Rothenberg and J. Weedon (2003). **"Antibodies to folate receptors impair embryogenesis and fetal development in the rat."** *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 67(10): 837-47.
- Dabelea, D., R. L. Hanson, P. H. Bennett, J. Roumain, W. C. Knowler and D. J. Pettitt (1998). **"Increasing prevalence of Type II diabetes in American Indian children."** *Diabetologia* 41(8): 904-10.
- Das, S. K., S. Yano, J. Wang, D. R. Edwards, H. Nagase and S. K. Dey (1997). **"Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period."** *Dev Genet* 21(1): 44-54.
- Das, U. N. (2008). **"Folic acid and polyunsaturated fatty acids improve cognitive function and prevent depression, dementia, and Alzheimer's disease--but how and why?"** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 78(1): 11-9.
- Davies, P., P. J. Bailey, M. M. Goldenberg and A. W. Ford-Hutchinson (1984). **"The role of arachidonic acid oxygenation products in pain and inflammation."** *Annu Rev Immunol* 2: 335-57.
- Davis, B. J., D. E. Lennard, C. A. Lee, H. F. Tian, S. G. Morham, W. C. Wetsel and R. Langenbach (1999). **"Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta."** *Endocrinology* 140(6): 2685-95.
- Dawson, V. L., T. M. Dawson, E. D. London, D. S. Bredt and S. H. Snyder (1991). **"Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures."** *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(14): 6368-71.
- de Jager, C. A., E. A. Linton, I. Spyropoulou, I. L. Sargent and C. W. Redman (2003). **"Matrix metalloproteinase-9, placental syncytiotrophoblast and the endothelial dysfunction of pre-eclampsia."** *Placenta* 24(1): 84-91.
- DeClerck, Y. A., N. Perez, H. Shimada, T. C. Boone, K. E. Langley and S. M. Taylor (1992). **"Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases."** *Cancer Res* 52(3): 701-8.
- Delerive, P., K. De Bosscher, S. Besnard, W. Vanden Berghe, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, J. C. Fruchart, A. Tedgui, G. Haegeman and B. Staels (1999). **"Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1."** *J Biol Chem* 274(45): 32048-54.
- DeLuca, J. G., T. W. Doebber, L. J. Kelly, R. K. Kemp, S. Molon-Noblot, S. P. Sahoo, J. Ventre, M. S. Wu, J. M. Peters, F. J. Gonzalez and D. E. Moller (2000). **"Evidence for peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha-independent peroxisome proliferation: effects of PPARgamma/delta-specific agonists in PPARalpha-null mice."** *Mol Pharmacol* 58(3): 470-6.
- Demers, L. M., S. G. Gabbe, C. A. Villee and R. O. Greep (1973). **"Human chorionic gonadotropin-mediated glycogenolysis in human placental villi: a role of prostaglandins."** *Biochim Biophys Acta* 313(1): 202-10.
- Denninger, J. W. and M. A. Marletta (1999). **"Guanylate cyclase and the .NO/ cGMP signaling pathway."** *Biochim Biophys Acta* 1411(2-3): 334-50.
- Derosa, G., M. A. Avanzini, D. Geroldi, R. Fogari, R. Lorini, A. De Silvestri, C. Tinelli, G. Rondini and G. d'Annunzio (2005). **"Matrix metalloproteinase 2 may be a marker of microangiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus."** *Diabetes Res Clin Pract* 70(2): 119-25.

- Derosa, G., A. D'Angelo, C. Tinelli, E. Devangelio, A. Consoli, R. Miccoli, G. Penno, S. Del Prato, S. Paniga and A. F. Cicero (2007). "Evaluation of metalloproteinase 2 and 9 levels and their inhibitors in diabetic and healthy subjects." *Diabetes Metab* 33(2): 129-34.
- Desmarais, J. A., F. L. Lopes, H. Zhang, S. K. Das and B. D. Murphy (2007). "The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates trophoblast cell differentiation in mink (*Mustela vison*)." *Biol Reprod* 77(5): 829-39.
- Desoye, G. and E. Shafirir (1996). "The human placenta in diabetic pregnancy." *Diabetic Reviews* 4: 70 - 89.
- Desvergne, B., L. Michalik and W. Wahli (2004). "Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road." *Mol Endocrinol* 18(6): 1321-32.
- Desvergne, B., L. Michalik and W. Wahli (2006). "Transcriptional regulation of metabolism." *Physiol Rev* 86(2): 465-514.
- Desvergne, B. and W. Wahli (1999). "Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism." *Endocr Rev* 20(5): 649-88.
- Devchand, P. R., H. Keller, J. M. Peters, M. Vazquez, F. J. Gonzalez and W. Wahli (1996). "The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control." *Nature* 384(6604): 39-43.
- Dheen, S. T., S. S. Tay, J. Boran, L. W. Ting, S. D. Kumar, J. Fu and E. A. Ling (2009). "Recent studies on neural tube defects in embryos of diabetic pregnancy: an overview." *Curr Med Chem* 16(18): 2345-54.
- Di Loreto, S., B. D'Angelo, M. A. D'Amico, E. Benedetti, L. Cristiano, B. Cinque, M. G. Cifone, M. P. Ceru, C. Festuccia and A. Cimini (2007). "PPARbeta agonists trigger neuronal differentiation in the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y." *J Cell Physiol* 211(3): 837-47.
- Diamant, Y. Z., N. Mayorek, S. Neumann and E. Shafirir (1975). "Enzymes of glucose and fatty acid metabolism in early and term human placenta." *Am J Obstet Gynecol* 121(1): 58-61.
- Diamant, Y. Z., S. Neuman and E. Shafirir (1975). "Effect of chorionic gonadotropin, triamcinolone, progesterone and estrogen on enzymes of placenta and liver in rats." *Biochim Biophys Acta* 385(2): 257-67.
- Diamond, M. P., K. H. Moley, A. Pellicer, W. K. Vaughn and A. H. DeCherney (1989). "Effects of streptozotocin- and alloxan-induced diabetes mellitus on mouse follicular and early embryo development." *J Reprod Fertil* 86(1): 1-10.
- Dogne, J. M., X. de Leval, P. Benoit, S. Rolin, B. Pirotte and B. Masereel (2002). "Therapeutic potential of thromboxane inhibitors in asthma." *Expert Opin Investig Drugs* 11(2): 275-81.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev* 82(1): 47-95.
- Duncan, W. C., P. J. Illingworth and H. M. Fraser (1996). "Expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in the primate ovary during induced luteal regression." *J Endocrinol* 151(2): 203-13.
- Dunn-Albanese, L. R., W. E. t. Ackerman, Y. Xie, J. D. Iams and 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.
- Eberhart, C. E., R. J. Coffey, A. Radhika, F. M. Giardiello, S. Ferrenbach and R. N. DuBois (1994). "Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas." *Gastroenterology* 107(4): 1183-8.
- Efendic, S., A. Wajngot and M. Vranic (1985). "Increased activity of the glucose cycle in the liver: early characteristic of type 2 diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(9): 2965-9.
- Egeblad, M. and Z. Werb (2002). "New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression." *Nat Rev Cancer* 2(3): 161-74.
- Emmert-Buck, M. R., H. P. Emonard, M. L. Corcoran, H. C. Krutzsch, J. M. Foidart and W. G. Stetler-Stevenson (1995). "Cell surface binding of TIMP-2 and pro-MMP-2/ TIMP-2 complex." *FEBS Lett* 364(1): 28-32.
- Eriksson, R. S., L. Thunberg and U. J. Eriksson (1989). "Effects of interrupted insulin treatment on fetal outcome of pregnant diabetic rats." *Diabetes* 38(6): 764-72.
- Eriksson, U. J. (2009). "Congenital anomalies in diabetic pregnancy." *Semin Fetal Neonatal Med* 14(2): 85-93.
- Eriksson, U. J. and L. A. Borg (1993). "Diabetes and embryonic malformations. Role of substrate-induced free-oxygen radical production for dysmorphogenesis in cultured rat embryos." *Diabetes* 42(3): 411-9.
- Eriksson, U. J., L. A. Borg, H. Forsberg and J. Styruud (1991). "Diabetic embryopathy. Studies with animal and in vitro models." *Diabetes* 40 Suppl 2: 94-8.
- Eriksson, U. J., J. Cederberg and P. Wentzel (2003). "Congenital malformations in offspring of diabetic mothers--animal and human studies." *Rev Endocr Metab Disord* 4(1): 79-93.
- Eriksson, U. J. and L. Jansson (1984). "Diabetes in pregnancy: decreased placental blood flow and disturbed fetal development in the rat." *Pediatr Res* 18(8): 735-8.
- Espey, M. G., K. M. Miranda, R. M. Pluta and D. A. Wink (2000). "Nitrosative capacity of macrophages is dependent on nitric-oxide synthase induction signals." *J Biol Chem* 275(15): 11341-7.

- Faine, L. A., H. G. Rodrigues, C. M. Galhardi, G. M. Ebaid, Y. S. Diniz, C. R. Padovani and E. L. Novelli (2006). **"Effects of olive oil and its minor constituents on serum lipids, oxidative stress, and energy metabolism in cardiac muscle."** *Can J Physiol Pharmacol* 84(2): 239-45.
- Fajas, L., D. Auboeuf, E. Raspe, K. Schoonjans, A. M. Lefebvre, R. Saladin, J. Najib, M. Laville, J. C. Fruchart, S. Deeb, A. Vidal-Puig, J. Flier, M. R. Briggs, B. Staels, H. Vidal and J. Auwerx (1997). **"The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene."** *J Biol Chem* 272(30): 18779-89.
- Fanjul-Fernandez, M., A. R. Folgueras, S. Cabrera and C. Lopez-Otin (2010). **"Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models."** *Biochim Biophys Acta* 1803(1): 3-19.
- Farese, R. V., Jr., S. Cases, S. L. Ruland, H. J. Kayden, J. S. Wong, S. G. Young and R. L. Hamilton (1996). **"A novel function for apolipoprotein B: lipoprotein synthesis in the yolk sac is critical for maternal-fetal lipid transport in mice."** *J Lipid Res* 37(2): 347-60.
- Farrell, T., L. Neale and T. Cundy (2002). **"Congenital anomalies in the offspring of women with type 1, type 2 and gestational diabetes."** *Diabet Med* 19(4): 322-6.
- Fata, J. E., K. J. Leco, E. B. Voura, H. Y. Yu, P. Waterhouse, G. Murphy, R. A. Moorehead and R. Khokha (2001). **"Accelerated apoptosis in the Timp-3-deficient mammary gland."** *J Clin Invest* 108(6): 831-41.
- Feige, J. N., L. Gelman, L. Michalik, B. Desvergne and W. Wahli (2006). **"From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions."** *Prog Lipid Res* 45(2): 120-59.
- Feng, L., W. Sun, Y. Xia, W. W. Tang, P. Chanmugam, E. Soyoola, C. B. Wilson and D. Hwang (1993). **"Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression."** *Arch Biochem Biophys* 307(2): 361-8.
- Feng, Q., W. Song, X. Lu, J. A. Hamilton, M. Lei, T. Peng and S. P. Yee (2002). **"Development of heart failure and congenital septal defects in mice lacking endothelial nitric oxide synthase."** *Circulation* 106(7): 873-9.
- Ferreira, R., S. Llesuy, J. Milei, D. Scordo, H. Hourquebie, L. Molteni, C. de Palma and A. Boveris (1988). **"Assessment of myocardial oxidative stress in patients after myocardial revascularization."** *Am Heart J* 115(2): 307-12.
- Figueroa, R., E. Martinez, R. P. Fayngersh, N. Tejani, H. K. Mohazzab and M. S. Wolin (2000). **"Alterations in relaxation to lactate and H(2)O(2) in human placental vessels from gestational diabetic pregnancies."** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(3): H706-13.
- Fine, E. L., M. Horal, T. I. Chang, G. Fortin and M. R. Loeken (1999). **"Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy."** *Diabetes* 48(12): 2454-62.
- Fiorentino, L., A. Vivanti, M. Cavallera, V. Marzano, M. Ronci, M. Fabrizi, S. Menini, G. Pugliese, R. Menghini, R. Khokha, R. Lauro, A. Urbani and M. Federici (2010). **"Increased tumor necrosis factor alpha-converting enzyme activity induces insulin resistance and hepatosteatosis in mice."** *Hepatology* 51(1): 103-10.
- Fitzgerald, D. J., F. Wright and G. A. Fitzgerald (1989). **"Increased thromboxane biosynthesis during coronary thrombolysis. Evidence that platelet activation and thromboxane A2 modulate the response to tissue-type plasminogen activator in vivo."** *Circ Res* 65(1): 83-94.
- FitzGerald, G. A., A. K. Pedersen and C. Patrono (1983). **"Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease."** *Circulation* 67(6): 1174-7.
- Forman, B. M., J. Chen and R. M. Evans (1997). **"Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta."** *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4312-7.
- Forman, B. M., P. Tontonoz, J. Chen, R. P. Brun, B. M. Spiegelman and 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.
- Forstermann, U., E. I. Closs, J. S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath and H. Kleinert (1994). **"Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions."** *Hypertension* 23(6 Pt 2): 1121-31.
- Forstermann, U., J. S. Pollock, H. H. Schmidt, M. Heller and F. Murad (1991). **"Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells."** *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(5): 1788-92.
- Forstermann, U., J. S. Pollock, W. R. Tracey and M. Nakane (1994). **"Isoforms of nitric-oxide synthase: purification and regulation."** *Methods Enzymol* 233: 258-64.
- Fox, S. W. and J. W. Chow (1998). **"Nitric oxide synthase expression in bone cells."** *Bone* 23(1): 1-6.
- Francis, G. A., E. Fayard, F. Picard and J. Auwerx (2003). **"Nuclear receptors and the control of metabolism."** *Annu Rev Physiol* 65: 261-311.
- Fredenrich, A. and P. A. Grimaldi (2005). **"PPAR delta: an incompletely known nuclear receptor."** *Diabetes Metab* 31(1): 23-7.

- Freinkel, N. (1980). "**Banting Lecture 1980. Of pregnancy and progeny.**" *Diabetes* 29(12): 1023-35.
- Freinkel, N., B. E. Metzger, R. L. Phelps, S. L. Dooley, E. S. Ogata, R. M. Radvany and A. Belton (1985). "**Gestational diabetes mellitus. Heterogeneity of maternal age, weight, insulin secretion, HLA antigens, and islet cell antibodies and the impact of maternal metabolism on pancreatic B-cell and somatic development in the offspring.**" *Diabetes* 34 Suppl 2: 1-7.
- Friedman, S. A. (1988). "**Preeclampsia: a review of the role of prostaglandins.**" *Obstet Gynecol* 71(1): 122-37.
- Fuchs, A. R. and F. Fuchs (1984). "**Endocrinology of human parturition: a review.**" *Br J Obstet Gynaecol* 91(10): 948-67.
- Fukunaga, S., T. Ichiyama, S. Maeba, M. Okuda, M. Nakata, N. Sugino and S. Furukawa (2009). "**MMP-9 and TIMP-1 in the cord blood of premature infants developing BPD.**" *Pediatr Pulmonol* 44(3): 267-72.
- Funk, C. D. (2001). "**Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology.**" *Science* 294(5548): 1871-5.
- Gareskog, M., J. Cederberg, U. J. Eriksson and P. Wentzel (2007). "**Maternal diabetes in vivo and high glucose concentration in vitro increases apoptosis in rat embryos.**" *Reprod Toxicol* 23(1): 63-74.
- Gareskog, M., U. J. Eriksson and P. Wentzel (2006). "**Combined supplementation of folic acid and vitamin E diminishes diabetes-induced embryotoxicity in rats.**" *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 76(6): 483-90.
- Gearing, A. J., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A. H. Davidson, A. H. Drummond, W. A. Galloway, R. Gilbert, J. L. Gordon and et al. (1994). "**Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases.**" *Nature* 370(6490): 555-7.
- Geurts, N., E. Martens, I. Van Aelst, P. Proost, G. Opdenakker and P. E. Van den Steen (2008). "**Beta-hematin interaction with the hemopexin domain of gelatinase B/ MMP-9 provokes autocatalytic processing of the propeptide, thereby priming activation by MMP-3.**" *Biochemistry* 47(8): 2689-99.
- Gharagozian, S., K. Svennevig, H. J. Bangstad, J. O. Winberg and S. O. Kolset (2009). "**Matrix metalloproteinases in subjects with type 1 diabetes.**" *BMC Clin Pathol* 9: 7.
- Giacco, F. and M. Brownlee (2010). "**Oxidative stress and diabetic complications.**" *Circ Res* 107(9): 1058-70.
- Giannattasio, A., M. G. Calevo, G. Minniti, D. Gianotti, M. Cotellessa, F. Napoli, R. Lorini and G. d'Annunzio (2010). "**Folic acid, vitamin B12, and homocysteine levels during fasting and after methionine load in patients with Type 1 diabetes mellitus.**" *J Endocrinol Invest* 33(5): 297-9.
- Gilbert, S. (2000). *Developmental Biology 6th edition*, Sinauer Associates.
- Gilroy, D. W., P. R. Colville-Nash, D. Willis, J. Chivers, M. J. Paul-Clark and D. A. Willoughby (1999). "**Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties.**" *Nat Med* 5(6): 698-701.
- Gillio-Meina, C., S. H. Phang, J. P. Mather, B. S. Knight and T. G. Kennedy (2009). "**Expression patterns and role of prostaglandin-endoperoxide synthases, prostaglandin E synthases, prostacyclin synthase, prostacyclin receptor, peroxisome proliferator-activated receptor delta and retinoid x receptor alpha in rat endometrium during artificially-induced decidualization.**" *Reproduction* 137(3): 537-52.
- Giordano, F. J. (2005). "**Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure.**" *J Clin Invest* 115(3): 500-8.
- Girotti, A. W. (1985). "**Mechanisms of lipid peroxidation.**" *J Free Radic Biol Med* 1(2): 87-95.
- Glasser, S. R., S. Lampelo, M. I. Munir and J. Julian (1987). "**Expression of desmin, laminin and fibronectin during in situ differentiation (decidualization) of rat uterine stromal cells.**" *Differentiation* 35(2): 132-42.
- Gobeil, F., Jr., I. Dumont, A. M. Marrache, A. Vazquez-Tello, S. G. Bernier, D. Abran, X. Hou, M. H. Beauchamp, C. Quiniou, A. Bouayad, S. Choufani, M. Bhattacharya, S. Molotchnikoff, A. Ribeiro-Da-Silva, D. R. Varma, G. Bkaily and S. Chemtob (2002). "**Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP(3) receptors.**" *Circ Res* 90(6): 682-9.
- Gobeil, F., Jr., A. Vazquez-Tello, A. M. Marrache, M. Bhattacharya, D. Checchin, G. Bkaily, P. Lachapelle, A. Ribeiro-Da-Silva and S. Chemtob (2003). "**Nuclear prostaglandin signaling system: biogenesis and actions via heptahelical receptors.**" *Can J Physiol Pharmacol* 81(2): 196-204.
- Goh, Y. I. and G. Koren (2008). "**Folic acid in pregnancy and fetal outcomes.**" *J Obstet Gynaecol* 28(1): 3-13.
- Gomez-Cabrera, M. C., E. Domenech and J. Vina (2008). "**Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training.**" *Free Radic Biol Med* 44(2): 126-31.
- Gonzalez, E., A. Jawerbaum, V. Novaro, D. Sinner and M. Gimeno (1998). "**Nitric oxide modulates placental prostanoid production from late pregnant non-insulin-dependent diabetic rat.**" *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 59(5): 299-304.

- Gonzalez, E., J. Rosello-Catafau, A. Jawerbaum, D. Sinner, C. Pustovrh, J. Vela, V. White, C. Xaus, C. Peralta and M. Gimeno (2000). "**Pancreatic nitric oxide and oxygen free radicals in the early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat.**" *Braz J Med Biol Res* 33(11): 1335-42.
- Gonzalez, F. J., J. M. Peters and R. C. Cattley (1998). "**Mechanism of action of the nongenotoxic peroxisome proliferators: role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha.**" *J Natl Cancer Inst* 90(22): 1702-9.
- Goody, M. F. and C. A. Henry (2010). "**Dynamic interactions between cells and their extracellular matrix mediate embryonic development.**" *Mol Reprod Dev* 77(6): 475-88.
- Granger, J. P., B. T. Alexander, M. T. Llinas, W. A. Bennett and R. A. Khalil (2001). "**Pathophysiology of hypertension during preeclampsia linking placental ischemia with endothelial dysfunction.**" *Hypertension* 38(3 Pt 2): 718-22.
- Green, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok and S. R. Tannenbaum (1982). "**Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids.**" *Anal Biochem* 126(1): 131-8.
- Greene, J., M. Wang, Y. E. Liu, L. A. Raymond, C. Rosen and Y. E. Shi (1996). "**Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4.**" *J Biol Chem* 271(48): 30375-80.
- Griendling, K. K., D. Sorescu and M. Ushio-Fukai (2000). "**NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease.**" *Circ Res* 86(5): 494-501.
- Groft, L. L., H. Muzik, N. B. Rewcastle, R. N. Johnston, V. Knauper, M. A. Lafleur, P. A. Forsyth and D. R. Edwards (2001). "**Differential expression and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas.**" *Br J Cancer* 85(1): 55-63.
- Gross, S. S. and M. S. Wolin (1995). "**Nitric oxide: pathophysiological mechanisms.**" *Annu Rev Physiol* 57: 737-69.
- Gu, Z., M. Kaul, B. Yan, S. J. Kridel, J. Cui, A. Strongin, J. W. Smith, R. C. Liddington and S. A. Lipton (2002). "**S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death.**" *Science* 297(5584): 1186-90.
- Guedez, L., W. G. Stetler-Stevenson, L. Wolff, J. Wang, P. Fukushima, A. Mansoor and M. Stetler-Stevenson (1998). "**In vitro suppression of programmed cell death of B cells by tissue inhibitor of metalloproteinases-1.**" *J Clin Invest* 102(11): 2002-10.
- Gumbiner, B. M. (1992). "**Epithelial morphogenesis.**" *Cell* 69(3): 385-7.
- Gupta, R. A. and R. N. Dubois (2001). "**Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2.**" *Nat Rev Cancer* 1(1): 11-21.
- Gupta, R. A., J. Tan, W. F. Krause, M. W. Geraci, T. M. Willson, S. K. Dey and R. N. DuBois (2000). "**Prostacyclin-mediated activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta in colorectal cancer.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(24): 13275-80.
- Guyot, R., S. Magre, P. Leduque and B. Le Magueresse-Battistoni (2003). "**Differential expression of tissue inhibitor of metalloproteinases type 1 (TIMP-1) during mouse gonad development.**" *Dev Dyn* 227(3): 357-66.
- Halliwell, B. (2007). "**Biochemistry of oxidative stress.**" *Biochem Soc Trans* 35(Pt 5): 1147-50.
- Hamberg, M., J. Svensson and B. Samuelsson (1975). "**Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(8): 2994-8.
- Hamm, C. W., R. L. Lorenz, W. Bleifeld, W. Kupper, W. Wober and P. C. Weber (1987). "**Biochemical evidence of platelet activation in patients with persistent unstable angina.**" *J Am Coll Cardiol* 10(5): 998-1006.
- Han, V. K., E. S. Hunter, 3rd, R. M. Pratt, J. G. Zenguei and D. C. Lee (1987). "**Expression of rat transforming growth factor alpha mRNA during development occurs predominantly in the maternal decidua.**" *Mol Cell Biol* 7(7): 2335-43.
- Han, X., Y. Sun, S. Scott and D. Bleich (2001). "**Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 prevents cytokine-mediated dysfunction and cytotoxicity in pancreatic islets and beta-cells.**" *Diabetes* 50(5): 1047-55.
- Hannon, T. S., G. Rao and S. A. Arslanian (2005). "**Childhood obesity and type 2 diabetes mellitus.**" *Pediatrics* 116(2): 473-80.
- Hansen, J. B., H. Zhang, T. H. Rasmussen, R. K. Petersen, E. N. Flindt and K. Kristiansen (2001). "**Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta)-mediated regulation of preadipocyte proliferation and gene expression is dependent on cAMP signaling.**" *J Biol Chem* 276(5): 3175-82.
- Harris, S. G., J. Padilla, L. Koumas, D. Ray and R. P. Phipps (2002). "**Prostaglandins as modulators of immunity.**" *Trends Immunol* 23(3): 144-50.
- Hauser, S., G. Adelmant, P. Sarraf, H. M. Wright, E. Mueller and 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.
- Hawkins, B. T., T. F. Lundeen, K. M. Norwood, H. L. Brooks and R. D. Egleton (2007). "**Increased blood-brain barrier permeability and altered tight junctions in experimental diabetes in the rat: contribution of hyperglycaemia and matrix metalloproteinases.**" *Diabetologia* 50(1): 202-11.

- Hayakawa, T., K. Yamashita, E. Ohuchi and A. Shinagawa (1994). "**Cell growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2).**" *J Cell Sci* 107 (Pt 9): 2373-9.
- Hayakawa, T., K. Yamashita, K. Tanzawa, E. Uchijima and K. Iwata (1992). "**Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells. A possible new growth factor in serum.**" *FEBS Lett* 298(1): 29-32.
- Hayden, M. R. and S. C. Tyagi (2004). "**Homocysteine and reactive oxygen species in metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and atheroscleropathy: the pleiotropic effects of folate supplementation.**" *Nutr J* 3: 4.
- Heath, C. W., Jr. (1966). "**Cytogenetic observations in vitamin B12 and folate deficiency.**" *Blood* 27(6): 800-15.
- Helliwell, R. J., L. F. Adams and M. D. Mitchell (2004). "**Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis.**" *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70(2): 101-13.
- Hemberger, M., T. Nozaki, M. Masutani and J. C. Cross (2003). "**Differential expression of angiogenic and vasodilatory factors by invasive trophoblast giant cells depending on depth of invasion.**" *Dev Dyn* 227(2): 185-91.
- Henning, S. M., M. E. Swendseid, B. T. Ivandic and F. Liao (1997). "**Vitamins C, E and A and heme oxygenase in rats fed methyl/ folate-deficient diets.**" *Free Radic Biol Med* 23(6): 936-42.
- Herrera, E., M. Palacin, A. Martin and M. A. Lasuncion (1985). "**Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity.**" *Diabetes* 34 Suppl 2: 42-6.
- Herz, J. and R. V. Farese, Jr. (1999). "**The LDL receptor gene family, apolipoprotein B and cholesterol in embryonic development.**" *J Nutr* 129(2S Suppl): 473S-475S.
- Hetzl, M., D. Walcher, M. Grub, H. Bach, V. Hombach and N. Marx (2003). "**Inhibition of MMP-9 expression by PPARgamma activators in human bronchial epithelial cells.**" *Thorax* 58(9): 778-83.
- Hi, R., S. Osada, N. Yumoto and T. Osumi (1999). "**Characterization of the amino-terminal activation domain of peroxisome proliferator-activated receptor alpha. Importance of alpha-helical structure in the transactivating function.**" *J Biol Chem* 274(49): 35152-8.
- Higa, R., E. Gonzalez, M. C. Pustovrh, V. White, E. Capobianco, N. Martinez and A. Jawerbaum (2007). "**PPARdelta and its activator PGI2 are reduced in diabetic embryopathy: involvement of PPARdelta activation in lipid metabolic and signalling pathways in rat embryo early organogenesis.**" *Mol Hum Reprod* 13(2): 103-10.
- Higashiyama, H., A. N. Billin, Y. Okamoto, M. Kinoshita and 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 and W. Wahli (2002). "**PPARs: transcriptional effectors of fatty acids and their derivatives.**" *Cell Mol Life Sci* 59(5): 790-8.
- Hirotsani, M., T. Tsukamoto, J. Bourdeaux, H. Sadano and T. Osumi (2001). "**Stabilization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha by the ligand.**" *Biochem Biophys Res Commun* 288(1): 106-10.
- Hod, M., S. Star, J. V. Passonneau, T. G. Unterman and N. Freinkel (1986). "**Effect of hyperglycemia on sorbitol and myo-inositol content of cultured rat conceptus: failure of aldose reductase inhibitors to modify myo-inositol depletion and dysmorphogenesis.**" *Biochem Biophys Res Commun* 140(3): 974-80.
- Holdsworth-Carson, S. J., R. Lim, A. Mitton, C. Whitehead, G. E. Rice, M. Permezel and M. Lappas (2010). "**Peroxisome proliferator-activated receptors are altered in pathologies of the human placenta: gestational diabetes mellitus, intrauterine growth restriction and preeclampsia.**" *Placenta* 31(3): 222-9.
- Hostetler, H. A., A. D. Petrescu, A. B. Kier and F. Schroeder (2005). "**Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands.**" *J Biol Chem* 280(19): 18667-82.
- Hsu, S. C. and C. J. Huang (2006). "**Reduced fat mass in rats fed a high oleic acid-rich safflower oil diet is associated with changes in expression of hepatic PPARalpha and adipose SREBP-1c-regulated genes.**" *J Nutr* 136(7): 1779-85.
- Huang, J. C., F. Arbab, K. J. Tumbusch, J. S. Goldsby, N. Matijevic-Aleksic and K. K. Wu (2002). "**Human fallopian tubes express prostacyclin (PGI) synthase and cyclooxygenases and synthesize abundant PGI.**" *J Clin Endocrinol Metab* 87(9): 4361-8.
- Huang, J. C., J. S. Goldsby and W. S. Wun (2004). "**Prostacyclin enhances the implantation and live birth potentials of mouse embryos.**" *Hum Reprod* 19(8): 1856-60.
- Huang, J. C., W. S. Wun, J. S. Goldsby, I. C. Wun, S. M. Falconi and K. K. Wu (2003). "**Prostacyclin enhances embryo hatching but not sperm motility.**" *Hum Reprod* 18(12): 2582-9.
- Hulboy, D. L., L. A. Rudolph and L. M. Matrisian (1997). "**Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function.**" *Mol Hum Reprod* 3(1): 27-45.
- Hussain, S. P., L. J. Hofseth and C. C. Harris (2003). "**Radical causes of cancer.**" *Nat Rev Cancer* 3(4): 276-85.

- Imren, S., D. B. Kohn, H. Shimada, L. Blavier and Y. A. DeClerck (1996). **"Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 retroviral-mediated gene transfer in vivo inhibits tumor growth and invasion."** *Cancer Res* 56(13): 2891-5.
- Inoue, I., S. Noji, T. Awata, K. Takahashi, T. Nakajima, M. Sonoda, T. Komoda and S. Katayama (1998). **"Bezafibrate has an antioxidant effect: peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with Cu²⁺, Zn²⁺-superoxide dismutase in the liver."** *Life Sci* 63(2): 135-44.
- Inoue, I., S. Noji, M. Z. Shen, K. Takahashi and S. Katayama (1997). **"The peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) regulates the plasma thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) level."** *Biochem Biophys Res Commun* 237(3): 606-10.
- Ischiropoulos, H., L. Zhu, J. Chen, M. Tsai, J. C. Martin, C. D. Smith and J. S. Beckman (1992). **"Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase."** *Arch Biochem Biophys* 298(2): 431-7.
- Issemann, I. and S. Green (1990). **"Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators."** *Nature* 347(6294): 645-50.
- Izuora, K. E., H. P. Chase, W. E. Jackson, J. R. Coll, I. M. Osberg, P. A. Gottlieb, M. J. Rewers and S. K. Garg (2005). **"Inflammatory markers and diabetic retinopathy in type 1 diabetes."** *Diabetes Care* 28(3): 714-5.
- Janero, D. R. (1990). **"Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury."** *Free Radic Biol Med* 9(6): 515-40.
- Jansson, T., I. Cetin, T. L. Powell, G. Desoye, T. Radaelli, A. Ericsson and C. P. Sibley (2006). **"Placental transport and metabolism in fetal overgrowth -- a workshop report."** *Placenta* 27 Suppl A: S109-13.
- Jawerbaum, A. and E. Capobianco (2010). **"Review: Effects of PPAR activation in the placenta and the fetus: Implications in maternal diabetes."** *Placenta*.
- Jawerbaum, A., E. Capobianco, C. Pustovrh, V. White, M. Baier, S. Salzberg, M. Pesaresi and E. Gonzalez (2004). **"Influence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation by its endogenous ligand 15-deoxy Delta^{12,14} prostaglandin J₂ on nitric oxide production in term placental tissues from diabetic women."** *Mol Hum Reprod* 10(9): 671-6.
- Jawerbaum, A., J. R. Catafau, E. T. Gonzalez, V. Novaro, G. Gomez, E. Gelpi and M. A. Gimeno (1996). **"Eicosanoid production, metabolism and contractile activity in the isolated uterus from non-insulin-dependent diabetic rats during late pregnancy."** *Prostaglandins* 51(5): 307-20.
- Jawerbaum, A. and 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. and E. Gonzalez (2006). **"Diabetic pregnancies: the challenge of developing in a pro-inflammatory environment."** *Curr Med Chem* 13(18): 2127-38.
- Jawerbaum, A., E. T. Gonzalez, P. Carolina, S. Deborja, P. Christian and M. A. Gimeno (1999). **"Diminished levels of prostaglandin E in type I diabetic oocyte-cumulus complexes. Influence of nitric oxide and superoxide dismutase."** *Reprod Fertil Dev* 11(2): 105-10.
- Jawerbaum, A., E. T. Gonzalez, A. Faletti, V. Novaro, A. Vitullo and M. A. Gimeno (1996). **"Altered prostanoid production by cumulus-oocyte complexes in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus."** *Prostaglandins* 52(3): 209-19.
- Jawerbaum, A., E. T. Gonzalez, V. Novaro, A. Faletti and M. A. Gimeno (1998). **"Nitric oxide mediates increased prostaglandin E production by oocyte-cumulus complexes in the non-insulin-dependent diabetic rat."** *Reprod Fertil Dev* 10(2): 185-90.
- Jawerbaum, A., E. T. Gonzalez, V. Novaro, A. Faletti, D. Sinner and M. A. Gimeno (1998). **"Increased prostaglandin E generation and enhanced nitric oxide synthase activity in the non-insulin-dependent diabetic embryo during organogenesis."** *Reprod Fertil Dev* 10(2): 191-6.
- Jawerbaum, A., E. T. Gonzalez, D. Sinner, C. Pustovrh, V. White and M. A. Gimeno (2000). **"Diminished PGE₂ content, enhanced PGE₂ release and defects in 3H-PGE₂ transport in embryos from overtly diabetic rats."** *Reprod Fertil Dev* 12(3-4): 141-7.
- Jawerbaum, A., R. Higa, V. White, E. Capobianco, C. Pustovrh, D. Sinner, N. Martinez and E. Gonzalez (2005). **"Peroxynitrites and impaired modulation of nitric oxide concentrations in embryos from diabetic rats during early organogenesis."** *Reproduction* 130(5): 695-703.
- Jawerbaum, A., D. Sinner, V. White, C. Pustovrh, E. Capobianco, M. A. Gimeno and E. T. Gonzalez (2001). **"Modulation of PGE₂ generation in the diabetic embryo: effect of nitric oxide and superoxide dismutase."** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 64(2): 127-33.
- Jawerbaum, A., D. Sinner, V. White, C. Pustovrh, E. Capobianco and E. Gonzalez (2002). **"Modulation of nitric oxide concentration and lipid metabolism by 15-deoxy Delta^{12,14} prostaglandin J₂ in embryos from control and diabetic rats during early organogenesis."** *Reproduction* 124(5): 625-31.
- Jawerbaum, A. and V. White (2010). **"Animal models in diabetes and pregnancy."** *Endocr Rev* 31(5): 680-701.

- Jaworski, D. M., P. Soloway, J. Caterina and W. A. Falls (2006). **"Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2)-deficient mice display motor deficits."** *J Neurobiol* 66(1): 82-94.
- Jebelovszki, E., C. Kiraly, N. Erdei, A. Feher, E. T. Pasztor, I. Rutkai, T. Forster, I. Edes, A. Koller and Z. Bagi (2008). **"High-fat diet-induced obesity leads to increased NO sensitivity of rat coronary arterioles: role of soluble guanylate cyclase activation."** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(6): H2558-64.
- Jian Liu, K. and G. A. Rosenberg (2005). **"Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia."** *Free Radic Biol Med* 39(1): 71-80.
- Jiang, C., A. T. Ting and B. Seed (1998). **"PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines."** *Nature* 391(6662): 82-6.
- Jiang, X., D. Mu, C. Manabat, A. A. Koshy, S. Christen, M. G. Tauber, Z. S. Vexler and D. M. Ferriero (2004). **"Differential vulnerability of immature murine neurons to oxygen-glucose deprivation."** *Exp Neurol* 190(1): 224-32.
- Juge-Aubry, C. E., E. Hammar, C. Siegrist-Kaiser, A. Pernin, A. Takeshita, W. W. Chin, A. G. Burger and 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.
- Jungheim, E. S. and K. H. Moley (2008). **"The impact of type 1 and type 2 diabetes mellitus on the oocyte and the preimplantation embryo."** *Semin Reprod Med* 26(2): 186-95.
- Junod, A., A. E. Lambert, L. Orci, R. Pictet, A. E. Gonet and A. E. Renold (1967). **"Studies of the diabetogenic action of streptozotocin."** *Proc Soc Exp Biol Med* 126(1): 201-5.
- Kaitu'u, T. J., J. Shen, J. Zhang, N. B. Morison and L. A. Salamonsen (2005). **"Matrix metalloproteinases in endometrial breakdown and repair: functional significance in a mouse model."** *Biol Reprod* 73(4): 672-80.
- Kalkhoff, R. K. (1982). **"Metabolic effects of progesterone."** *Am J Obstet Gynecol* 142(6 Pt 2): 735-8.
- Kang, S., X. W. Zhao, N. Wang, S. C. Chen, R. M. Zhou and Y. Li (2008). **"Association of polymorphisms of the MMP-2 and TIMP-2 genes with the risk of endometriosis in North Chinese women."** *Fertil Steril* 90(5): 2023-9.
- Kapoor, A., Y. Shintani, M. Collino, M. F. Osuchowski, D. Busch, N. S. Patel, B. Sepodes, S. Castiglia, R. Fantozzi, D. Bishop-Bailey, H. Mota-Filipe, M. M. Yaqoob, K. Suzuki, S. Bahrami, B. Desvergne, J. A. Mitchell and C. Thiemermann (2010). **"Protective Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- β / δ in Septic Shock."** *Am J Respir Crit Care Med*.
- Kashiwagi, M., M. Tortorella, H. Nagase and K. Brew (2001). **"TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5)."** *J Biol Chem* 276(16): 12501-4.
- Katz, S. and P. A. Abrahamsohn (1987). **"Involution of the antimesometrial decidua in the mouse. An ultrastructural study."** *Anat Embryol (Berl)* 176(2): 251-8.
- Kaufmann, M. B., JBL (1999). **The anatomical basis of mouse development.** A. Press.
- Kautzky-Willer, A., R. Prager, W. Waldhausl, G. Pacini, K. Thomaseth, O. F. Wagner, M. Ulm, C. Strelli and B. Ludvik (1997). **"Pronounced insulin resistance and inadequate beta-cell secretion characterize lean gestational diabetes during and after pregnancy."** *Diabetes Care* 20(11): 1717-23.
- Kawate, N., M. Tsuji, H. Tamada, T. Inaba and T. Sawada (2004). **"Enhancement of prostacyclin synthesis at the beginning of formation of caprine corpora lutea."** *Mol Reprod Dev* 67(3): 308-12.
- Keller, J. M., P. Collet, A. Bianchi, C. Huin, P. Bouillaud-Kremarik, P. Becuwe, H. Schohn, L. Domenjoud and M. Dauca (2000). **"Implications of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in development, cell life status and disease."** *Int J Dev Biol* 44(5): 429-42.
- Kennedy, T. G., C. Gillio-Meina and S. H. Phang (2007). **"Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization."** *Reproduction* 134(5): 635-43.
- Kersten, S., B. Desvergne and W. Wahli (2000). **"Roles of PPARs in health and disease."** *Nature* 405(6785): 421-4.
- Kersten, S., J. Seydoux, J. M. Peters, F. J. Gonzalez, B. Desvergne and W. Wahli (1999). **"Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting."** *J Clin Invest* 103(11): 1489-98.
- Kersten, S. and W. Wahli (2000). **"Peroxisome proliferator activated receptor agonists."** *Exs* 89: 141-51.
- Khan, H., O. Ishihara, M. H. Sullivan and M. G. Elder (1992). **"Changes in decidual stromal cell function associated with labour."** *Br J Obstet Gynaecol* 99(1): 10-2.
- Kim, H. J., M. Y. Kim, H. Jin, H. J. Kim, S. S. Kang, H. J. Kim, J. H. Lee, K. C. Chang, J. Y. Hwang, C. Yabe-Nishimura, J. H. Kim and H. G. Seo (2009). **"Peroxisome proliferator-activated receptor δ regulates extracellular matrix and apoptosis of vascular smooth muscle cells through the activation of transforming growth factor- β 1/Smad3."** *Circ Res* 105(1): 16-24.
- Kim, S. F., D. A. Huri and S. H. Snyder (2005). **"Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2."** *Science* 310(5756): 1966-70.

- Kim, S. T., K. Marquard, S. Stephens, E. Loudon, J. Allsworth and K. H. Moley (2011). "**Adiponectin and adiponectin receptors in the mouse preimplantation embryo and uterus.**" *Hum Reprod* 26(1): 82-95.
- King, G. L. and M. R. Loeken (2004). "**Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications.**" *Histochem Cell Biol* 122(4): 333-8.
- Kinoshita, T., H. Sato, A. Okada, E. Ohuchi, K. Imai, Y. Okada and M. Seiki (1998). "**TIMP-2 promotes activation of progelatinase A by membrane-type 1 matrix metalloproteinase immobilized on agarose beads.**" *J Biol Chem* 273(26): 16098-103.
- Kitzmler, J. L., J. P. Cloherty, M. D. Younger, A. Tabatabaie, S. B. Rothchild, I. Sosenko, M. F. Epstein, S. Singh and R. K. Neff (1978). "**Diabetic pregnancy and perinatal morbidity.**" *Am J Obstet Gynecol* 131(5): 560-80.
- Klein, D. J., L. Aronson Friedman, W. R. Harlan, B. A. Barton, G. B. Schreiber, R. M. Cohen, L. C. Harlan and J. A. Morrison (2004). "**Obesity and the development of insulin resistance and impaired fasting glucose in black and white adolescent girls: a longitudinal study.**" *Diabetes Care* 27(2): 378-83.
- Kleinert, H., P. M. Schwarz and U. Forstermann (2003). "**Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase.**" *Biol Chem* 384(10-11): 1343-64.
- Knauf, C., V. Prevot, G. B. Stefano, G. Mortreux, J. C. Beauvillain and D. Croix (2001). "**Evidence for a spontaneous nitric oxide release from the rat median eminence: influence on gonadotropin-releasing hormone release.**" *Endocrinology* 142(6): 2343-50.
- Kobayashi, T. and S. Narumiya (2002). "**Function of prostanoid receptors: studies on knockout mice.**" *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 557-73.
- Komar, C. M., O. Braissant, W. Wahli and 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.
- Korgun, E. T., G. Dohr, G. Desoye, R. Demir, U. A. Kayisli and T. Hahn (2003). "**Expression of insulin, insulin-like growth factor I and glucocorticoid receptor in rat uterus and embryo during decidualization, implantation and organogenesis.**" *Reproduction* 125(1): 75-84.
- Kosaka, H. (1999). "**Nitric oxide and hemoglobin interactions in the vasculature.**" *Biochim Biophys Acta* 1411(2-3): 370-7.
- Kossenjans, W., A. Eis, R. Sahay, D. Brockman and L. Myatt (2000). "**Role of peroxynitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes or preeclampsia.**" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(4): H1311-9.
- Kraling, B. M., D. G. Wiederschain, T. Boehm, M. Rehn, J. B. Mulliken and M. A. Moses (1999). "**The role of matrix metalloproteinase activity in the maturation of human capillary endothelial cells in vitro.**" *J Cell Sci* 112 (Pt 10): 1599-609.
- Krishnamachar, S. and N. L. Canolty (1986). "**Influence of diet composition on intake and utilization of protein and energy in diabetic and control rats.**" *J Nutr* 116(3): 461-71.
- Kudo, I. and M. Murakami (2002). "**Phospholipase A2 enzymes.**" *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 3-58.
- Kuhn, D. C., J. J. Botti, P. H. Cherouny and L. M. Demers (1990). "**Eicosanoid production and transfer in the placenta of the diabetic pregnancy.**" *Prostaglandins* 40(2): 205-15.
- Kumar, R. and E. B. Thompson (1999). "**The structure of the nuclear hormone receptors.**" *Steroids* 64(5): 310-9.
- Kuroda, T., H. Hirota, Y. Fujio, S. Sugiyama, M. Masaki, Y. Hiramoto, W. Shioyama, K. Okamoto, M. Hori and K. Yamauchi-Takahara (2007). "**Carbacyclin induces carnitine palmitoyltransferase-1 in cardiomyocytes via peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) delta independent of the IP receptor signaling pathway.**" *J Mol Cell Cardiol* 43(1): 54-62.
- Kurschat, P., P. Zigrino, R. Nischt, K. Breitkopf, P. Steurer, C. E. Klein, T. Krieg and C. Mauch (1999). "**Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 regulates matrix metalloproteinase-2 activation by modulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity in high and low invasive melanoma cell lines.**" *J Biol Chem* 274(30): 21056-62.
- Kurtz, M., E. Capobianco, N. Martinez, J. Fernandez, R. Higa, V. White and A. Jawerbaum (2010). "**Carbaprostacyclin, a PPARdelta agonist, ameliorates excess lipid accumulation in diabetic rat placentas.**" *Life Sci* 86(21-22): 781-90.
- Lambert, E., E. Dasse, B. Haye and E. Petitfrere (2004). "**TIMPs as multifacial proteins.**" *Crit Rev Oncol Hematol* 49(3): 187-98.
- Lappas, M., M. Permezel, H. M. Georgiou and G. E. Rice (2002). "**Regulation of proinflammatory cytokines in human gestational tissues by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: effect of 15-deoxy-Delta(12,14)-PGJ(2) and troglitazone.**" *J Clin Endocrinol Metab* 87(10): 4667-72.
- Lappas, M., M. Permezel and G. E. Rice (2006). "**15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) and troglitazone regulation of the release of phospholipid metabolites, inflammatory cytokines and proteases from human gestational tissues.**" *Placenta* 27(11-12): 1060-72.

- Lavee, M., S. Goldman, E. Daniel-Spiegel and E. Shalev (2009). "**Matrix metalloproteinase-2 is elevated in midtrimester amniotic fluid prior to the development of preeclampsia.**" *Reprod Biol Endocrinol* 7: 85.
- Leach, L., A. Taylor and F. Sciota (2009). "**Vascular dysfunction in the diabetic placenta: causes and consequences.**" *J Anat* 215(1): 69-76.
- Leco, K. J., R. Khokha, N. Pavloff, S. P. Hawkes and D. R. Edwards (1994). "**Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues.**" *J Biol Chem* 269(12): 9352-60.
- Lee, Q. P. and M. R. Juchau (1994). "**Dysmorphogenic effects of nitric oxide (NO) and NO-synthase inhibition: studies with intra-amniotic injections of sodium nitroprusside and NG-monomethyl-L-arginine.**" *Teratology* 49(6): 452-64.
- LeFever, A. and A. Funahashi (1990). "**Elevated prostaglandin E2 levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with bronchogenic carcinoma.**" *Chest* 98(6): 1397-402.
- Lehmann, J. M., L. B. Moore, T. A. Smith-Oliver, W. O. Wilkison, T. M. Willson and S. A. Kliewer (1995). "**An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma).**" *J Biol Chem* 270(22): 12953-6.
- Leipold, H., M. Knoefler, C. Gruber, A. Huber, P. Haslinger and C. Worda (2006). "**Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha gene variations are not associated with gestational diabetes mellitus.**" *J Soc Gynecol Investig* 13(2): 104-7.
- Leone, T. C., C. J. Weinheimer and D. P. Kelly (1999). "**A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13): 7473-8.
- Leuenberger, N., S. Pradervand and W. Wahli (2009). "**Sumoylated PPARalpha mediates sex-specific gene repression and protects the liver from estrogen-induced toxicity in mice.**" *J Clin Invest* 119(10): 3138-48.
- Levin, A. A., L. J. Sturzenbecker, S. Kazmer, T. Bosakowski, C. Huselton, G. Allenby, J. Speck, C. Kratzenisen, M. Rosenberger, A. Lovey and et al. (1992). "**9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha.**" *Nature* 355(6358): 359-61.
- Lewis, D. F., M. N. Jacobs, M. Dickins and B. G. Lake (2002). "**Molecular modelling of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) from human, rat and mouse, based on homology with the human PPAR gamma crystal structure.**" *Toxicol In Vitro* 16(3): 275-80.
- Li, D., L. Pickell, Y. Liu, Q. Wu, J. S. Cohn and R. Rozen (2005). "**Maternal methylenetetrahydrofolate reductase deficiency and low dietary folate lead to adverse reproductive outcomes and congenital heart defects in mice.**" *Am J Clin Nutr* 82(1): 188-95.
- Li, J., T. R. Billiar, R. V. Talanian and Y. M. Kim (1997). "**Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation.**" *Biochem Biophys Res Commun* 240(2): 419-24.
- Li, L., M. C. Beauchamp and G. Renier (2002). "**Peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma agonists upregulate human macrophage lipoprotein lipase expression.**" *Atherosclerosis* 165(1): 101-10.
- Li, M., G. Pascual and C. K. Glass (2000). "**Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene.**" *Mol Cell Biol* 20(13): 4699-707.
- Li, Z., J. Froehlich, Z. S. Galis and E. G. Lakatta (1999). "**Increased expression of matrix metalloproteinase-2 in the thickened intima of aged rats.**" *Hypertension* 33(1): 116-23.
- Lijnen, H. R., D. Demeulemeester, B. Van Hoef, D. Collen and E. Maquoi (2003). "**Deficiency of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) impairs nutritionally induced obesity in mice.**" *Thromb Haemost* 89(2): 249-55.
- Lillicrop, K. A., E. S. Phillips, A. A. Jackson, M. A. Hanson and G. C. Burdge (2005). "**Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring.**" *J Nutr* 135(6): 1382-6.
- Lim, H. and S. K. Dey (2000). "**PPAR delta functions as a prostacyclin receptor in blastocyst implantation.**" *Trends Endocrinol Metab* 11(4): 137-42.
- Lim, H., R. A. Gupta, W. G. Ma, B. C. Paria, D. E. Moller, J. D. Morrow, R. N. DuBois, J. M. Trzaskos and S. K. Dey (1999). "**Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta.**" *Genes Dev* 13(12): 1561-74.
- Lim, M. S., L. Guedez, W. G. Stetler-Stevenson and M. Stetler-Stevenson (1999). "**Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 induces apoptosis in human T lymphocytes.**" *Ann N Y Acad Sci* 878: 522-3.
- Lin, Q., S. E. Ruuska, N. S. Shaw, D. Dong and N. Noy (1999). "**Ligand selectivity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha.**" *Biochemistry* 38(1): 185-90.
- Linask, K. K., M. Han, D. H. Cai, P. R. Brauer and S. M. Maisastry (2005). "**Cardiac morphogenesis: matrix metalloproteinase coordination of cellular mechanisms underlying heart tube formation and directionality of looping.**" *Dev Dyn* 233(3): 739-53.

- Lindegaard, M. L. and L. B. Nielsen (2008). "**Maternal diabetes causes coordinated down-regulation of genes involved with lipid metabolism in the murine fetal heart.**" *Metabolism* 57(6): 766-73.
- Lizarraga, F., M. Espinosa, V. Maldonado and J. Melendez-Zajgla (2005). "**Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 is expressed in cervical cancer patients.**" *Anticancer Res* 25(1B): 623-7.
- Locksmith, G. J. and P. Duff (1998). "**Preventing neural tube defects: the importance of periconceptional folic acid supplements.**" *Obstet Gynecol* 91(6): 1027-34.
- Lopez-Luna, P., T. Munoz and E. Herrera (1986). "**Body fat in pregnant rats at mid- and late-gestation.**" *Life Sci* 39(15): 1389-93.
- Lyll, F., J. L. Gibson, I. A. Greer, D. E. Brockman, A. L. Eis and L. Myatt (1998). "**Increased nitrotyrosine in the diabetic placenta: evidence for oxidative stress.**" *Diabetes Care* 21(10): 1753-8.
- MacMicking, J., Q. W. Xie and C. Nathan (1997). "**Nitric oxide and macrophage function.**" *Annu Rev Immunol* 15: 323-50.
- Maden, M. (2000). "**The role of retinoic acid in embryonic and post-embryonic development.**" *Proc Nutr Soc* 59(1): 65-73.
- Mandal, M., A. Mandal, S. Das, T. Chakraborti and C. Sajal (2003). "**Clinical implications of matrix metalloproteinases.**" *Mol Cell Biochem* 252(1-2): 305-29.
- Mandard, S., M. Muller and S. Kersten (2004). "**Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes.**" *Cell Mol Life Sci* 61(4): 393-416.
- Mangelsdorf, D. J., U. Borgmeyer, R. A. Heyman, J. Y. Zhou, E. S. Ong, A. E. Oro, A. Kakizuka and R. M. Evans (1992). "**Characterization of three RXR genes that mediate the action of 9-cis retinoic acid.**" *Genes Dev* 6(3): 329-44.
- Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995). "**The RXR heterodimers and orphan receptors.**" *Cell* 83(6): 841-50.
- Mano, H., C. Kimura, Y. Fujisawa, T. Kameda, M. Watanabe-Mano, H. Kaneko, T. Kaneda, Y. Hakeda and M. Kumegawa (2000). "**Cloning and function of rabbit peroxisome proliferator-activated receptor delta/ beta in mature osteoclasts.**" *J Biol Chem* 275(11): 8126-32.
- Martinez-Frias, M. L. (1994). "**Epidemiological analysis of outcomes of pregnancy in diabetic mothers: identification of the most characteristic and most frequent congenital anomalies.**" *Am J Med Genet* 51(2): 108-13.
- Martinez-Frias, M. L., E. Bermejo, E. Rodriguez-Pinilla, L. Prieto and J. L. Frias (1998). "**Epidemiological analysis of outcomes of pregnancy in gestational diabetic mothers.**" *Am J Med Genet* 78(2): 140-5.
- Martinez, N., E. Capobianco, V. White, M. C. Pustovrh, R. Higa and A. Jawerbaum (2007). "**Peroxisome proliferator activated receptor alpha activation regulates lipid metabolism in the feto-placental unit from diabetic rats.**" *Reproduction* Enviado a publicar.
- Martinez, N., E. Capobianco, V. White, M. C. Pustovrh, R. Higa and 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., V. White, M. Kurtz, R. Higa, E. Capobianco and A. Jawerbaum (2010). "**Activation of the nuclear receptor PPARalpha regulates lipid metabolism in foetal liver from diabetic rats: implications in diabetes-induced foetal overgrowth.**" *Diabetes Metab Res Rev* 27(1): 35-46.
- Martinez, N., V. White, M. Kurtz, R. Higa, E. Capobianco and A. Jawerbaum (2010). "**Activation of the nuclear receptor PPARalpha regulates lipid metabolism in foetal liver from diabetic rats: implications in diabetes-induced foetal overgrowth.**" *Diabetes Metab Res Rev*.
- Marvin, K. W., R. L. Eykholt, J. A. Keelan, T. A. Sato and 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.
- Marx, N., U. Schonbeck, M. A. Lazar, P. Libby and J. Plutzky (1998). "**Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells.**" *Circ Res* 83(11): 1097-103.
- Matsumoto, K., N. Yamauchi, R. Watanabe, S. Oozono, K. Kubota, K. Nishimura, C. Wood, T. Soh, K. Kizaki and M. A. Hattori (2009). "**In vitro decidualization of rat endometrial stromal cells.**" *Cell Tissue Res* 335(3): 575-83.
- Matsuura, H., H. Adachi, R. C. Smart, X. Xu, J. Arata and A. M. Jetten (1999). "**Correlation between expression of peroxisome proliferator-activated receptor beta and squamous differentiation in epidermal and tracheobronchial epithelial cells.**" *Mol Cell Endocrinol* 147(1-2): 85-92.
- McGarry, J. D. (2002). "**Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes.**" *Diabetes* 51(1): 7-18.
- McQuibban, G. A., J. H. Gong, E. M. Tam, C. A. McCulloch, I. Clark-Lewis and C. M. Overall (2000). "**Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3.**" *Science* 289(5482): 1202-6.

- Merchant, S. J. and S. T. Davidge (2004). "The role of matrix metalloproteinases in vascular function: implications for normal pregnancy and pre-eclampsia." *Bjog* 111(9): 931-9.
- Michael Weindling, A. (2009). "Offspring of diabetic pregnancy: short-term outcomes." *Semin Fetal Neonatal Med* 14(2): 111-8.
- Michalik, L., B. Desvergne, C. Dreyer, M. Gavillet, R. N. Laurini and W. Wahli (2002). "PPAR expression and function during vertebrate development." *Int J Dev Biol* 46(1): 105-14.
- Michalik, L. and W. Wahli (2007). "Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in skin health, repair and disease." *Biochim Biophys Acta* 1771(8): 991-8.
- Mills, J. L., L. Baker and A. S. Goldman (1979). "Malformations in infants of diabetic mothers occur before the seventh gestational week. Implications for treatment." *Diabetes* 28(4): 292-3.
- Mitchell, J. A., F. Ali, L. Bailey, L. Moreno and L. S. Harrington (2008). "Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium." *Exp Physiol* 93(1): 141-7.
- Moellering, D., J. Mc Andrew, R. P. Patel, H. J. Forman, R. T. Mulcahy, H. Jo and V. M. Darley-Usmar (1999). "The induction of GSH synthesis by nanomolar concentrations of NO in endothelial cells: a role for gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyl transpeptidase." *FEBS Lett* 448(2-3): 292-6.
- Moens, A. L., C. J. Vrints, M. J. Claeys, J. P. Timmermans, H. C. Champion and D. A. Kass (2008). "Mechanisms and potential therapeutic targets for folic acid in cardiovascular disease." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(5): H1971-7.
- Mogi, K. and R. Toyozumi (2010). "Invasion by matrix metalloproteinase-expressing cells is important for primitive streak formation in early chick blastoderm." *Cells Tissues Organs* 192(1): 1-16.
- Moley, K. H. (2001). "Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women." *Trends Endocrinol Metab* 12(2): 78-82.
- Moley, K. H., W. K. Vaughn, A. H. DeCherney and M. P. Diamond (1991). "Effect of diabetes mellitus on mouse pre-implantation embryo development." *J Reprod Fertil* 93(2): 325-32.
- Molin, D. G., P. A. Roest, H. Nordstrand, L. J. Wisse, R. E. Poelmann, U. J. Eriksson and A. C. Gittenberger-De Groot (2004). "Disturbed morphogenesis of cardiac outflow tract and increased rate of aortic arch anomalies in the offspring of diabetic rats." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 70(12): 927-38.
- Moncada, S., R. M. Palmer and E. A. Higgs (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* 43(2): 109-42.
- Moncada, S., M. W. Radomski and R. M. Palmer (1988). "Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function." *Biochem Pharmacol* 37(13): 2495-501.
- Moncada, S. and J. R. Vane (1978). "Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin." *Pharmacol Rev* 30(3): 293-331.
- Mook, O. R., C. Van Overbeek, E. G. Ackema, F. Van Maldegem and W. M. Frederiks (2003). "In situ localization of gelatinolytic activity in the extracellular matrix of metastases of colon cancer in rat liver using quenched fluorogenic DQ-gelatin." *J Histochem Cytochem* 51(6): 821-9.
- Moraes, L. A., L. Piqueras and D. Bishop-Bailey (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation." *Pharmacol Ther* 110(3): 371-85.
- Morgan, S. C., F. Relaix, L. L. Sandell and M. R. Loeken (2008). "Oxidative stress during diabetic pregnancy disrupts cardiac neural crest migration and causes outflow tract defects." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 82(6): 453-63.
- Morifuji, M., C. Sanbongi and K. Sugiura (2006). "Dietary soya protein intake and exercise training have an additive effect on skeletal muscle fatty acid oxidation enzyme activities and mRNA levels in rats." *Br J Nutr* 96(3): 469-75.
- Morita, I., M. Schindler, M. K. Regier, J. C. Otto, T. Hori, D. L. DeWitt and W. L. Smith (1995). "Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2." *J Biol Chem* 270(18): 10902-8.
- Mott, J. D., C. L. Thomas, M. T. Rosenbach, K. Takahara, D. S. Greenspan and M. J. Banda (2000). "Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor." *J Biol Chem* 275(2): 1384-90.
- Munroe, D. G. and C. Y. Lau (1995). "Turning down the heat: new routes to inhibition of inflammatory signaling by prostaglandin H₂ synthases." *Chem Biol* 2(6): 343-50.
- Murphy, G. and F. Willenbrock (1995). "Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases." *Methods Enzymol* 248: 496-510.
- Murphy, M. P. (1999). "Nitric oxide and cell death." *Biochim Biophys Acta* 1411(2-3): 401-14.
- Myatt, L. (2010). "Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta." *Placenta* 31 Suppl: S66-9.
- Myatt, L., A. Brewer and D. E. Brockman (1991). "The action of nitric oxide in the perfused human fetal-placental circulation." *Am J Obstet Gynecol* 164(2): 687-92.
- Myatt, L., A. S. Brewer, G. Langdon and D. E. Brockman (1992). "Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal-placental circulation." *Am J Obstet Gynecol* 166(1 Pt 1): 224-30.

- Myers, T. O., E. J. Messina, A. M. Rodrigues and M. E. Gerritsen (1985). "**Altered aortic and cremaster muscle prostaglandin synthesis in diabetic rats.**" *Am J Physiol* 249(4 Pt 1): E374-9.
- Nagase, H. and J. F. Woessner, Jr. (1999). "**Matrix metalloproteinases.**" *J Biol Chem* 274(31): 21491-4.
- Nagatomo, Y., B. A. Carabello, M. L. Coker, P. J. McDermott, S. Nemoto, M. Hamawaki and F. G. Spinale (2000). "**Differential effects of pressure or volume overload on myocardial MMP levels and inhibitory control.**" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278(1): H151-61.
- Nagy, L., P. Tontonoz, J. G. Alvarez, H. Chen and R. M. Evans (1998). "**Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma.**" *Cell* 93(2): 229-40.
- Nakanishi, Y., F. Sugiura, J. Kishi and T. Hayakawa (1986). "**Collagenase inhibitor stimulates cleft formation during early morphogenesis of mouse salivary gland.**" *Dev Biol* 113(1): 201-6.
- Nakano, E., J. A. Higgins and H. J. Powers (2001). "**Folate protects against oxidative modification of human LDL.**" *Br J Nutr* 86(6): 637-9.
- Nakayama, T., M. Soma, S. Saito, J. Honye, J. Yajima, D. Rahmutula, Y. Kaneko, M. Sato, J. Uwabo, N. Aoi, K. Kosuge, M. Kunimoto, K. Kanmatsuse and S. Kokubun (2002). "**Association of a novel single nucleotide polymorphism of the prostacyclin synthase gene with myocardial infarction.**" *Am Heart J* 143(5): 797-801.
- Naruse, K., G. E. Lash, B. A. Innes, H. A. Otun, R. F. Searle, S. C. Robson and J. N. Bulmer (2009). "**Localization of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitors for MMPs (TIMPs) in uterine natural killer cells in early human pregnancy.**" *Hum Reprod* 24(3): 553-61.
- Nasrallah, R. and R. L. Hebert (2004). "**Reduced IP receptors in STZ-induced diabetic rat kidneys and high-glucose-treated mesangial cells.**" *Am J Physiol Renal Physiol* 287(4): F673-81.
- Nasrallah, R. and R. L. Hebert (2005). "**Prostacyclin signaling in the kidney: implications for health and disease.**" *Am J Physiol Renal Physiol* 289(2): F235-46.
- Nath, A. K., J. Enciso, M. Kuniyasu, X. Y. Hao, J. A. Madri and E. Pinter (2004). "**Nitric oxide modulates murine yolk sac vasculogenesis and rescues glucose induced vasculopathy.**" *Development* 131(10): 2485-96.
- Nathan, C. (1992). "**Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.**" *Faseb J* 6(12): 3051-64.
- Ni, H., T. Sun, X. H. Ma and Z. M. Yang (2003). "**Expression and regulation of cytosolic prostaglandin E synthase in mouse uterus during the peri-implantation period.**" *Biol Reprod* 68(3): 744-50.
- Nishida, K., D. G. Harrison, J. P. Navas, A. A. Fisher, S. P. Dockery, M. Uematsu, R. M. Nerem, R. W. Alexander and T. J. Murphy (1992). "**Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase.**" *J Clin Invest* 90(5): 2092-6.
- Nishikawa, T., D. Edelstein, X. L. Du, S. Yamagishi, T. Matsumura, Y. Kaneda, M. A. Yorek, D. Beebe, P. J. Oates, H. P. Hammes, I. Giardino and M. Brownlee (2000). "**Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage.**" *Nature* 404(6779): 787-90.
- Nordberg, J. and E. S. Arner (2001). "**Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.**" *Free Radic Biol Med* 31(11): 1287-312.
- Norwitz, E. R., D. J. Schust and S. J. Fisher (2001). "**Implantation and the survival of early pregnancy.**" *N Engl J Med* 345(19): 1400-8.
- Nothnick, W. B. (2000). "**Disruption of the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene results in altered reproductive cyclicity and uterine morphology in reproductive-age female mice.**" *Biol Reprod* 63(3): 905-12.
- Nothnick, W. B. (2003). "**Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) deficient mice display reduced serum progesterone levels during corpus luteum development.**" *Endocrinology* 144(1): 5-8.
- Nothnick, W. B. and T. E. Curry, Jr. (1996). "**Divergent effects of interleukin-1 beta on steroidogenesis and matrix metalloproteinase inhibitor expression and activity in cultured rat granulosa cells.**" *Endocrinology* 137(9): 3784-90.
- Novaro, V., E. Gonzalez, A. Jawerbaum, V. Rettori, G. Canteros and M. F. Gimeno (1997). "**Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation.**" *Reprod Fertil Dev* 9(5): 557-64.
- Novaro, V., A. Jawerbaum, A. Faletti, M. A. Gimeno and E. T. Gonzalez (1998). "**Uterine nitric oxide and prostaglandin E during embryonic implantation in non-insulin-dependent diabetic rats.**" *Reprod Fertil Dev* 10(3): 217-23.
- Novaro, V., V. Rettori, E. T. Gonzalez, A. Jawerbaum, A. Faletti, G. Canteros and M. A. de Gimeno (1996). "**Interaction between uterine PGE and PGF2 alpha production and the nitridergic system during embryonic implantation in the rat.**" *Prostaglandins* 51(6): 363-76.

- Nuttall, R. K. and T. G. Kennedy (1999). "**Gelatinases A and B and tissue inhibitors of metalloproteinases 1, 2, and 3 during in vivo and in vitro decidualization of rat endometrial stromal cells.**" *Biol Reprod* 60(2): 471-8.
- Nuttall, R. K., C. L. Sampieri, C. J. Pennington, S. E. Gill, G. A. Schultz and D. R. Edwards (2004). "**Expression analysis of the entire MMP and TIMP gene families during mouse tissue development.**" *FEBS Lett* 563(1-3): 129-34.
- Oates, J. C., C. M. Reilly, M. B. Crosby and G. S. Gilkeson (2002). "**Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists: potential use for treating chronic inflammatory diseases.**" *Arthritis Rheum* 46(3): 598-605.
- Oh, J., R. Takahashi, S. Kondo, A. Mizoguchi, E. Adachi, R. M. Sasahara, S. Nishimura, Y. Imamura, H. Kitayama, D. B. Alexander, C. Ide, T. P. Horan, T. Arakawa, H. Yoshida, S. Nishikawa, Y. Itoh, M. Seiki, S. Itohara, C. Takahashi and M. Noda (2001). "**The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis.**" *Cell* 107(6): 789-800.
- Okamoto, T., R. Niu, S. Yamada and M. Osawa (2002). "**Reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 in gestational trophoblastic diseases.**" *Mol Hum Reprod* 8(4): 392-8.
- Okere, I. C., M. P. Chandler, T. A. McElfresh, J. H. Rennison, V. Sharov, H. N. Sabbah, K. Y. Tserng, B. D. Hoit, P. Ernsberger, M. E. Young and W. C. Stanley (2006). "**Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin.**" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291(1): H38-44.
- Oliver, W. R., Jr., J. L. Shenk, M. R. Snaithe, C. S. Russell, K. D. Plunket, N. L. Bodkin, M. C. Lewis, D. A. Winegar, M. L. Sznajdman, M. H. Lambert, H. E. Xu, D. D. Sternbach, S. A. Kliewer, B. C. Hansen and T. M. Willson (2001). "**A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9): 5306-11.
- Olson, D. M., K. Skinner and J. R. Challis (1983). "**Prostaglandin output in relation to parturition by cells dispersed from human intrauterine tissues.**" *J Clin Endocrinol Metab* 57(4): 694-9.
- Orci, L., A. Junod, R. Pictet, A. E. Renold and C. Rouiller (1968). "**Granulolysis in a cells of endocrine pancreas in spontaneous and experimental diabetes in animals.**" *J Cell Biol* 38(2): 62-6.
- Ornoy, A. (2007). "**Embryonic oxidative stress as a mechanism of teratogenesis with special emphasis on diabetic embryopathy.**" *Reprod Toxicol* 24(1): 31-41.
- Overall, C. M. (1994). "**Regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression.**" *Ann N Y Acad Sci* 732: 51-64.
- Overall, C. M. (1995). "**Repression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase expression by all-trans-retinoic acid in rat bone cell populations: comparison with transforming growth factor-beta 1.**" *J Cell Physiol* 164(1): 17-25.
- Overall, C. M. (2002). "**Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites.**" *Mol Biotechnol* 22(1): 51-86.
- Overall, C. M. and C. Lopez-Otin (2002). "**Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era.**" *Nat Rev Cancer* 2(9): 657-72.
- Oyama, K., Y. Sugimura, T. Murase, A. Uchida, S. Hayasaka, Y. Oiso and Y. Murata (2009). "**Folic acid prevents congenital malformations in the offspring of diabetic mice.**" *Endocr J* 56(1): 29-37.
- Palmer, R. M., D. S. Ashton and S. Moncada (1988). "**Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.**" *Nature* 333(6174): 664-6.
- Pampfer, S., I. Vanderheyden and R. De Hertogh (1997). "**Increased synthesis of tumor necrosis factor-alpha in uterine explants from pregnant diabetic rats and in primary cultures of uterine cells in high glucose.**" *Diabetes* 46(7): 1214-24.
- Pampfer, S., I. Vanderheyden, J. E. McCracken, J. Vesela and R. De Hertogh (1997). "**Increased cell death in rat blastocysts exposed to maternal diabetes in utero and to high glucose or tumor necrosis factor-alpha in vitro.**" *Development* 124(23): 4827-36.
- Parr, E. L., L. H. Young, M. B. Parr and J. D. Young (1990). "**Granulated metrial gland cells of pregnant mouse uterus are natural killer-like cells that contain perforin and serine esterases.**" *J Immunol* 145(7): 2365-72.
- Parr, M. B. and 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.
- Parr, M. B., E. L. Parr, K. Munaretto, M. R. Clark and S. K. Dey (1988). "**Immunohistochemical localization of prostaglandin synthase in the rat uterus and embryo during the peri-implantation period.**" *Biol Reprod* 38(2): 333-43.
- Pascual, G., A. L. Fong, S. Ogawa, A. Gamliel, A. C. Li, V. Perissi, D. W. Rose, T. M. Willson, M. G. Rosenfeld and C. K. Glass (2005). "**A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma.**" *Nature* 437(7059): 759-63.

- Paukkeri, E. L., T. Leppanen, O. Sareila, K. Vuolteenaho, H. Kankaanranta and E. Moilanen (2007). **"PPARalpha agonists inhibit nitric oxide production by enhancing iNOS degradation in LPS-treated macrophages."** *Br J Pharmacol* 152(7): 1081-91.
- Perez-Martinez, L. and D. M. Jaworski (2005). **"Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 promotes neuronal differentiation by acting as an anti-mitogenic signal."** *J Neurosci* 25(20): 4917-29.
- Peters, J. M., S. S. Lee, W. Li, J. M. Ward, O. Gavrilova, C. Everett, M. L. Reitman, L. D. Hudson and F. J. Gonzalez (2000). **"Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta)."** *Mol Cell Biol* 20(14): 5119-28.
- Peunova, N. and G. Enikolopov (1995). **"Nitric oxide triggers a switch to growth arrest during differentiation of neuronal cells."** *Nature* 375(6526): 68-73.
- Piddington, R., J. Joyce, P. Dhanasekaran and L. Baker (1996). **"Diabetes mellitus affects prostaglandin E2 levels in mouse embryos during neurulation."** *Diabetologia* 39(8): 915-20.
- Plachta, N., A. Traister and M. Weil (2003). **"Nitric oxide is involved in establishing the balance between cell cycle progression and cell death in the developing neural tube."** *Exp Cell Res* 288(2): 354-62.
- Pogribny, I. P., B. J. Miller and S. J. James (1997). **"Alterations in hepatic p53 gene methylation patterns during tumor progression with folate/ methyl deficiency in the rat."** *Cancer Lett* 115(1): 31-8.
- Poleni, P. E., S. Etienne, E. Velot, P. Netter and A. Bianchi (2010). **"Activation of PPARs alpha, beta/delta, and gamma Impairs TGF-beta1-Induced Collagens' Production and Modulates the TIMP-1/ MMPs Balance in Three-Dimensional Cultured Chondrocytes."** *PPAR Res* 2010: 635912.
- Polette, M., B. Nawrocki, A. Pintiaux, C. Massenat, E. Maquoi, L. Volders, J. P. Schaaps, P. Birembaut and J. M. Foidart (1994). **"Expression of gelatinases A and B and their tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium."** *Lab Invest* 71(6): 838-46.
- Portha, B., L. Picon and G. Rosselin (1979). **"Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes."** *Diabetologia* 17(6): 371-7.
- Pozharny, Y., L. Lambertini, G. Clunie, L. Ferrara and M. J. Lee (2010). **"Epigenetics in women's health care."** *Mt Sinai J Med* 77(2): 225-35.
- Pratico, D., T. Cyrus, H. Li and G. A. FitzGerald (2000). **"Endogenous biosynthesis of thromboxane and prostacyclin in 2 distinct murine models of atherosclerosis."** *Blood* 96(12): 3823-6.
- Puente, X. S., L. M. Sanchez, C. M. Overall and C. Lopez-Otin (2003). **"Human and mouse proteases: a comparative genomic approach."** *Nat Rev Genet* 4(7): 544-58.
- Pustovrh, C., A. Jawerbaum, D. Sinner, M. Pesaresi, M. Baier, P. Micone, M. Gimeno and E. T. Gonzalez (2000). **"Membrane-type matrix metalloproteinase-9 activity in placental tissue from patients with pre-existing and gestational diabetes mellitus."** *Reprod Fertil Dev* 12(5-6): 269-75.
- Pustovrh, C., A. Jawerbaum, D. Sinner, V. White, E. Capobianco and E. Gonzalez (2002). **"Metalloproteinase 2 activity and modulation in uterus from neonatal streptozotocin-induced diabetic rats during embryo implantation."** *Reprod Fertil Dev* 14(7-8): 479-85.
- Pustovrh, M. C., E. Capobianco, N. Martinez, R. Higa, V. White and 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, J. J. Lopez-Costa and E. Gonzalez (2005). **"Increased matrix metalloproteinases 2 and 9 in placenta of diabetic rats at midgestation."** *Placenta* 26(4): 339-48.
- Pustovrh, M. C., A. Jawerbaum, E. Capobianco, V. White, N. Martinez, J. J. Lopez-Costa and E. Gonzalez (2005). **"Oxidative stress promotes the increase of matrix metalloproteinases-2 and -9 activities in the fetoplacental 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 and 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, J. H., Q. Ebrahim, N. Moore, G. Murphy, L. Claesson-Welsh, M. Bond, A. Baker and B. Anand-Apte (2003). **"A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2."** *Nat Med* 9(4): 407-15.
- Ra, H. J. and W. C. Parks (2007). **"Control of matrix metalloproteinase catalytic activity."** *Matrix Biol* 26(8): 587-96.
- Radaelli, T., A. Varastehpour, P. Catalano and S. Hauguel-de Mouzon (2003). **"Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways."** *Diabetes* 52(12): 2951-8.
- Radomski, M. W., R. M. Palmer and S. Moncada (1990). **"An L-arginine/ nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation."** *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(13): 5193-7.

- Rakieten, N., M. L. Rakieten and M. V. Nadkarni (1963). "**Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917).**" *Cancer Chemother Rep* 29: 91-8.
- Ramos, M. P., M. D. Crespo-Solans, S. del Campo, J. Cacho and E. Herrera (2003). "**Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness.**" *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(2): E318-28.
- Rathore, N., S. John, M. Kale and D. Bhatnagar (1998). "**Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues.**" *Pharmacol Res* 38(4): 297-303.
- Reece, E. A. (1999). "**Maternal fuels, diabetic embryopathy: pathomechanisms and prevention.**" *Semin Reprod Endocrinol* 17(2): 183-94.
- Reponen, P., I. Leivo, C. Sahlberg, S. S. Apte, B. R. Olsen, I. Thesleff and K. Tryggvason (1995). "**92-kDa type IV collagenase and TIMP-3, but not 72-kDa type IV collagenase or TIMP-1 or TIMP-2, are highly expressed during mouse embryo implantation.**" *Dev Dyn* 202(4): 388-96.
- Resta-Lenert, S. and K. E. Barrett (2002). "**Enteroinvasive bacteria alter barrier and transport properties of human intestinal epithelium: role of iNOS and COX-2.**" *Gastroenterology* 122(4): 1070-87.
- Reynolds, L. P. and D. A. Redmer (2001). "**Angiogenesis in the placenta.**" *Biol Reprod* 64(4): 1033-40.
- Rezk, B. M., G. R. Haenen, W. J. van der Vijgh and A. Bast (2003). "**Tetrahydrofolate and 5-methyltetrahydrofolate are folates with high antioxidant activity. Identification of the antioxidant pharmacophore.**" *FEBS Lett* 555(3): 601-5.
- Ricote, M. and C. K. Glass (2007). "**PPARs and molecular mechanisms of transrepression.**" *Biochim Biophys Acta* 1771(8): 926-35.
- Ricote, M., A. C. Li, T. M. Willson, C. J. Kelly and C. K. Glass (1998). "**The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation.**" *Nature* 391(6662): 79-82.
- Ricou, B., L. Nicod, S. Lacraz, H. G. Welgus, P. M. Suter and J. M. Dayer (1996). "**Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome.**" *Am J Respir Crit Care Med* 154(2 Pt 1): 346-52.
- Rigas, B., I. S. Goldman and L. Levine (1993). "**Altered eicosanoid levels in human colon cancer.**" *J Lab Clin Med* 122(5): 518-23.
- Ripley, D., R. Tunuguntla, L. Susi and N. Chegini (2006). "**Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitors of metalloproteinase-3 and -4 in normal ovary and ovarian carcinoma.**" *Int J Gynecol Cancer* 16(5): 1794-800.
- Rizzo, G. and S. Fiorucci (2006). "**PPARs and other nuclear receptors in inflammation.**" *Curr Opin Pharmacol* 6(4): 421-7.
- Rosen, E. D., P. Sarraf, A. E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D. S. Milstone, B. M. Spiegelman and R. M. Mortensen (1999). "**PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro.**" *Mol Cell* 4(4): 611-7.
- Rosen, E. D. and B. M. Spiegelman (2000). "**Molecular regulation of adipogenesis.**" *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 145-71.
- Rosenberg, G. A. (2009). "**Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases.**" *Lancet Neurol* 8(2): 205-16.
- Rosenquist, T. H. and R. H. Finnell (2001). "**Genes, folate and homocysteine in embryonic development.**" *Proc Nutr Soc* 60(1): 53-61.
- Roten, L., S. Nemoto, J. Simsic, M. L. Coker, V. Rao, S. Baicu, G. Defreyte, P. J. Soloway, M. R. Zile and F. G. Spinale (2000). "**Effects of gene deletion of the tissue inhibitor of the matrix metalloproteinase-type 1 (TIMP-1) on left ventricular geometry and function in mice.**" *J Mol Cell Cardiol* 32(1): 109-20.
- Rothe, F., K. Langnaese and G. Wolf (2005). "**New aspects of the location of neuronal nitric oxide synthase in the skeletal muscle: a light and electron microscopic study.**" *Nitric Oxide* 13(1): 21-35.
- Ruderman, N. B., J. R. Williamson and M. Brownlee (1992). "**Glucose and diabetic vascular disease.**" *Faseb J* 6(11): 2905-14.
- Ryan, E. A. and L. Enns (1988). "**Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance.**" *J Clin Endocrinol Metab* 67(2): 341-7.
- SAD (2010). Recomendaciones para gestantes con diabetes pregestacional. Revista de la Sociedad Argentina de Diabetes. **44 número 2.**
- Samuelsson, B., R. Morgenstern and P. J. Jakobsson (2007). "**Membrane prostaglandin E synthase-1: a novel therapeutic target.**" *Pharmacol Rev* 59(3): 207-24.
- Sato, H., T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto and M. Seiki (1994). "**A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells.**" *Nature* 370(6484): 61-5.
- Satoh, T., Y. Ishikawa, Y. Kataoka, Y. Cui, H. Yanase, K. Kato, Y. Watanabe, K. Nakadate, K. Matsumura, H. Hatanaka, K. Kataoka, R. Noyori, M. Suzuki and Y. Watanabe (1999). "**CNS-specific prostacyclin ligands as neuronal survival-promoting factors in the brain.**" *Eur J Neurosci* 11(9): 3115-24.

- Saunders, W. B., B. L. Bohnsack, J. B. Faske, N. J. Anthis, K. J. Bayless, K. K. Hirschi and G. E. Davis (2006). "**Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3.**" *J Cell Biol* 175(1): 179-91.
- Schellenberg, J. C. and W. Kirkby (1997). "**Production of prostaglandin F2 alpha and E2 in explants of intrauterine tissues of guinea pigs during late pregnancy and labor.**" *Prostaglandins* 54(3): 625-38.
- Schnaper, H. W., D. S. Grant, W. G. Stetler-Stevenson, R. Fridman, G. D'Orazi, A. N. Murphy, R. E. Bird, M. Hoythya, T. R. Fuerst, D. L. French and et al. (1993). "**Type IV collagenase(s) and TIMPs modulate endothelial cell morphogenesis in vitro.**" *J Cell Physiol* 156(2): 235-46.
- Schonfelder, G., M. John, H. Hopp, N. Fuhr, M. van Der Giet and M. Paul (1996). "**Expression of inducible nitric oxide synthase in placenta of women with gestational diabetes.**" *Faseb J* 10(7): 777-84.
- Schuler, M., F. Ali, C. Chambon, D. Duteil, J. M. Bornert, A. Tardivel, B. Desvergne, W. Wahli, P. Chambon and D. Metzger (2006). "**PGC1alpha expression is controlled in skeletal muscles by PPARbeta, whose ablation results in fiber-type switching, obesity, and type 2 diabetes.**" *Cell Metab* 4(5): 407-14.
- Schwarz, P. M., H. Kleinert and U. Forstermann (1999). "**Potential functional significance of brain-type and muscle-type nitric oxide synthase I expressed in adventitia and media of rat aorta.**" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(11): 2584-90.
- Seo, D. W., H. Li, L. Guedez, P. T. Wingfield, T. Diaz, R. Salloum, B. Y. Wei and W. G. Stetler-Stevenson (2003). "**TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism.**" *Cell* 114(2): 171-80.
- Shafir, E. and V. Barash (1991). "**Placental glycogen metabolism in diabetic pregnancy.**" *Isr J Med Sci* 27(8-9): 449-61.
- Shalom-Barak, T., J. M. Nicholas, Y. Wang, X. Zhang, E. S. Ong, T. H. Young, S. J. Gendler, R. M. Evans and Y. Barak (2004). "**Peroxisome proliferator-activated receptor gamma controls Muc1 transcription in trophoblasts.**" *Mol Cell Biol* 24(24): 10661-9.
- Shankland, S. J., H. Ly, K. Thai and J. W. Scholey (1996). "**Glomerular expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) in normal and diabetic rats.**" *J Am Soc Nephrol* 7(1): 97-104.
- Shapiro, S. D., D. K. Kobayashi and H. G. Welgus (1992). "**Identification of TIMP-2 in human alveolar macrophages. Regulation of biosynthesis is opposite to that of metalloproteinases and TIMP-1.**" *J Biol Chem* 267(20): 13890-4.
- Shen, D., C. Deng and M. Zhang (2007). "**Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists inhibit the proliferation and invasion of human colon cancer cells.**" *Postgrad Med J* 83(980): 414-9.
- Shen, X., S. Zheng, N. S. Metreveli and P. N. Epstein (2006). "**Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy.**" *Diabetes* 55(3): 798-805.
- Shipley, J. M., G. A. Doyle, C. J. Fliszar, Q. Z. Ye, L. L. Johnson, S. D. Shapiro, H. G. Welgus and R. M. Senior (1996). "**The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. Role of the fibronectin type II-like repeats.**" *J Biol Chem* 271(8): 4335-41.
- Shiva, S., P. S. Brookes, R. P. Patel, P. G. Anderson and V. M. Darley-Usmar (2001). "**Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(13): 7212-7.
- Sidorkina, O., M. G. Espey, K. M. Miranda, D. A. Wink and J. Laval (2003). "**Inhibition of poly(ADP-RIBOSE) polymerase (PARP) by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species.**" *Free Radic Biol Med* 35(11): 1431-8.
- Sies, H. and E. Cadenas (1985). "**Oxidative stress: damage to intact cells and organs.**" *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 311(1152): 617-31.
- Simeoni, U. and D. J. Barker (2009). "**Offspring of diabetic pregnancy: long-term outcomes.**" *Semin Fetal Neonatal Med* 14(2): 119-24.
- Simian, M., Y. Hirai, M. Navre, Z. Werb, A. Lochter and M. J. Bissell (2001). "**The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells.**" *Development* 128(16): 3117-31.
- Simmons, D. (2010). "**Metformin treatment for Type 2 diabetes in pregnancy?**" *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 24(4): 625-34.
- Singh, M. and M. Feigelson (1983). "**Effects of maternal diabetes on the levels, synthetic rates and activities of synthetic enzymes of surface-active phospholipids in perinatal rat lung.**" *Biochim Biophys Acta* 753(1): 53-9.
- Singla, D. K. and D. E. McDonald (2007). "**Factors released from embryonic stem cells inhibit apoptosis of H9c2 cells.**" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(3): H1590-5.
- Smith, W. L. (1989). "**The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action.**" *Biochem J* 259(2): 315-24.
- Spencer, A. G., J. W. Woods, T. Arakawa, Singer, II and W. L. Smith (1998). "**Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy.**" *J Biol Chem* 273(16): 9886-93.

- Spieß, K. and T. M. Zorn (2007). "**Collagen types I, III, and V constitute the thick collagen fibrils of the mouse decidua.**" *Microsc Res Tech* 70(1): 18-25.
- Spiteller, G. (2006). "**Peroxy radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products.**" *Free Radic Biol Med* 41(3): 362-87.
- Srikanta, S., A. T. Ricker, D. K. McCulloch, J. S. Soeldner, G. S. Eisenbarth and J. P. Palmer (1986). "**Autoimmunity to insulin, beta cell dysfunction, and development of insulin-dependent diabetes mellitus.**" *Diabetes* 35(2): 139-42.
- Stadler, K., M. G. Bonini, S. Dallas, J. Jiang, R. Radi, R. P. Mason and M. B. Kadiiska (2008). "**Involvement of inducible nitric oxide synthase in hydroxyl radical-mediated lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetes.**" *Free Radic Biol Med* 45(6): 866-74.
- Stadtman, E. R. and R. L. Levine (2003). "**Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins.**" *Amino Acids* 25(3-4): 207-18.
- Stamler, J. S. and G. Meissner (2001). "**Physiology of nitric oxide in skeletal muscle.**" *Physiol Rev* 81(1): 209-237.
- Staskus, P. W., F. R. Masiarz, L. J. Pallanck and S. P. Hawkes (1991). "**The 21-kDa protein is a transformation-sensitive metalloproteinase inhibitor of chicken fibroblasts.**" *J Biol Chem* 266(1): 449-54.
- Steffensen, B., U. M. Wallon and C. M. Overall (1995). "**Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/ type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen.**" *J Biol Chem* 270(19): 11555-66.
- Stetler-Stevenson, W. G. (2008). "**Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities.**" *Sci Signal* 1(27): re6.
- Stetler-Stevenson, W. G., P. D. Brown, M. Onisto, A. T. Levy and L. A. Liotta (1990). "**Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues.**" *J Biol Chem* 265(23): 13933-8.
- Stouffer, R. L., F. Xu and D. M. Duffy (2007). "**Molecular control of ovulation and luteinization in the primate follicle.**" *Front Biosci* 12: 297-307.
- Stover, P. J. (2004). "**Physiology of folate and vitamin B12 in health and disease.**" *Nutr Rev* 62(6 Pt 2): S3-12; discussion S13.
- Stroes, E. S., E. E. van Faassen, M. Yo, P. Martasek, P. Boer, R. Govers and T. J. Rabelink (2000). "**Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase.**" *Circ Res* 86(11): 1129-34.
- Styrud, J., L. Thunberg, O. Nybacka and U. J. Eriksson (1995). "**Correlations between maternal metabolism and deranged development in the offspring of normal and diabetic rats.**" *Pediatr Res* 37(3): 343-53.
- Suematsu, N., H. Tsutsui, J. Wen, D. Kang, M. Ikeuchi, T. Ide, S. Hayashidani, T. Shiomi, T. Kubota, N. Hamasaki and A. Takeshita (2003). "**Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes.**" *Circulation* 107(10): 1418-23.
- Sugimoto, Y. and S. Narumiya (2007). "**Prostaglandin E receptors.**" *J Biol Chem* 282(16): 11613-7.
- Sugimura, Y., T. Murase, K. Oyama, A. Uchida, N. Sato, S. Hayasaka, Y. Kano, Y. Takagishi, Y. Hayashi, Y. Oiso and Y. Murata (2009). "**Prevention of neural tube defects by loss of function of inducible nitric oxide synthase in fetuses of a mouse model of streptozotocin-induced diabetes.**" *Diabetologia* 52(5): 962-71.
- Sussman, I. and F. M. Matschinsky (1988). "**Diabetes affects sorbitol and myo-inositol levels of neuroectodermal tissue during embryogenesis in rat.**" *Diabetes* 37(7): 974-81.
- Suwaki, N., H. Masuyama, A. Masumoto, N. Takamoto and Y. Hiramatsu (2007). "**Expression and potential role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in the placenta of diabetic pregnancy.**" *Placenta* 28(4): 315-23.
- Svensson, J., M. Hamberg and B. Samuelsson (1976). "**On the formation and effects of thromboxane A2 in human platelets.**" *Acta Physiol Scand* 98(3): 285-94.
- Szabo, C. (2003). "**Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity.**" *Toxicol Lett* 140-141: 105-12.
- Takigawa, M., Y. Nishida, F. Suzuki, J. Kishi, K. Yamashita and T. Hayakawa (1990). "**Induction of angiogenesis in chick yolk-sac membrane by polyamines and its inhibition by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP and TIMP-2).**" *Biochem Biophys Res Commun* 171(3): 1264-71.
- Tan, N. S., L. Michalik, N. Noy, R. Yasmin, C. Pacot, M. Heim, B. Fluhmann, B. Desvergne and W. Wahli (2001). "**Critical roles of PPAR beta/ delta in keratinocyte response to inflammation.**" *Genes Dev* 15(24): 3263-77.
- Tarrade, A., K. Schoonjans, L. Pavan, J. Auwerx, C. Rochette-Egly, D. Evain-Brion and T. Fournier (2001). "**PPARgamma/ RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion.**" *J Clin Endocrinol Metab* 86(10): 5017-24.
- Tennis, M. A., M. Vanscoyk, R. L. Keith and R. A. Winn (2010). "**The role of prostacyclin in lung cancer.**" *Transl Res* 155(2): 57-61.

- Tesone, M., R. G. Ladenheim, R. M. Oliveira-Filho, V. A. Chiauuzzi, V. G. Foglia and E. H. Charreau (1983). "Ovarian dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats." *Proc Soc Exp Biol Med* 174(1): 123-30.
- Tester, A. M., J. H. Cox, A. R. Connor, A. E. Starr, R. A. Dean, X. S. Puente, C. Lopez-Otin and C. M. Overall (2007). "LPS responsiveness and neutrophil chemotaxis in vivo require PMN MMP-8 activity." *PLoS One* 2(3): e312.
- Thaler, C. D. and D. Epel (2003). "Nitric oxide in oocyte maturation, ovulation, fertilization, cleavage and implantation: a little dab'll do ya." *Curr Pharm Des* 9(5): 399-409.
- Tiboni, G. M., F. Giampietro and C. Di Giulio (2003). "The nitric oxide synthesis inhibitor Nomega-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) causes limb defects in mouse fetuses: protective effect of acute hyperoxia." *Pediatr Res* 54(1): 69-76.
- Tok, E. C., D. Ertunc, O. Bilgin, E. M. Erdal, M. Kaplanoglu and S. Dilek (2006). "Association of insulin receptor substrate-1 G972R variant with baseline characteristics of the patients with gestational diabetes mellitus." *Am J Obstet Gynecol* 194(3): 868-72.
- Tontonoz, P., E. Hu, R. A. Graves, A. I. Budavari and B. M. Spiegelman (1994). "mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer." *Genes Dev* 8(10): 1224-34.
- Tontonoz, P., L. Nagy, J. G. Alvarez, V. A. Thomazy and R. M. Evans (1998). "PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL." *Cell* 93(2): 241-52.
- Tranguch, S., N. Steuerwald and Y. M. Huet-Hudson (2003). "Nitric oxide synthase production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development." *Biol Reprod* 68(5): 1538-44.
- Tsuboi, K., Y. Sugimoto and A. Ichikawa (2002). "Prostanoid receptor subtypes." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 535-56.
- Turpaev, K. T. (2002). "Reactive oxygen species and regulation of gene expression." *Biochemistry (Mosc)* 67(3): 281-92.
- Ueno, N., M. Murakami, T. Tanioka, K. Fujimori, T. Tanabe, Y. Urade and I. Kudo (2001). "Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A2." *J Biol Chem* 276(37): 34918-27.
- Unger, R. H. and S. Grundy (1985). "Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes." *Diabetologia* 28(3): 119-21.
- Vadillo-Ortega, F. and G. Estrada-Gutierrez (2005). "Role of matrix metalloproteinases in preterm labour." *BJOG* 112 Suppl 1: 19-22.
- Valente, P., G. Fassina, A. Melchiori, L. Masiello, M. Cilli, A. Vacca, M. Onisto, L. Santi, W. G. Stetler-Stevenson and A. Albini (1998). "TIMP-2 over-expression reduces invasion and angiogenesis and protects B16F10 melanoma cells from apoptosis." *Int J Cancer* 75(2): 246-53.
- Van Assche, F. A., K. Holemans and L. Aerts (1998). "Fetal growth and consequences for later life." *J Perinat Med* 26(5): 337-46.
- Van Assche, F. A., K. Holemans and L. Aerts (2001). "Long-term consequences for offspring of diabetes during pregnancy." *Br Med Bull* 60: 173-82.
- Vassiliou, E. K., A. Gonzalez, C. Garcia, J. H. Tadros, G. Chakraborty and J. H. Toney (2009). "Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF-alpha both in vitro and in vivo systems." *Lipids Health Dis* 8: 25.
- Vercheval, M., R. De Hertogh, S. Pampfer, I. Vanderheyden, B. Michiels, P. De Bernardi and R. De Meyer (1990). "Experimental diabetes impairs rat embryo development during the preimplantation period." *Diabetologia* 33(4): 187-91.
- Viana, M., O. I. Aruoma, E. Herrera and B. Bonet (2000). "Oxidative damage in pregnant diabetic rats and their embryos." *Free Radic Biol Med* 29(11): 1115-21.
- Villalba, A., R. F. Iacono, S. N. Valdez and E. Poskus (2008). "Detection and immunochemical characterization of glutamic acid decarboxylase autoantibodies in patients with autoimmune diabetes mellitus." *Autoimmunity* 41(2): 143-53.
- Visse, R. and H. Nagase (2003). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry." *Circ Res* 92(8): 827-39.
- Vu, T. H. and Z. Werb (2000). "Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology." *Genes Dev* 14(17): 2123-33.
- Wahli, W. (2008). "PPAR gamma: ally and foe in bone metabolism." *Cell Metab* 7(3): 188-90.
- Wainfan, E. and L. A. Poirier (1992). "Methyl groups in carcinogenesis: effects on DNA methylation and gene expression." *Cancer Res* 52(7 Suppl): 2071s-2077s.
- Wang, H. and S. K. Dey (2005). "Lipid signaling in embryo implantation." *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 77(1-4): 84-102.
- Wang, H., H. Xie, X. Sun, S. Tranguch, H. Zhang, X. Jia, D. Wang, S. K. Das, B. Desvergne, W. Wahli, R. N. DuBois and S. K. Dey (2007). "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, Q., H. Fujii and G. T. Knipp (2002). "Expression of PPAR and RXR isoforms in the developing rat and human term placentas." *Placenta* 23(8-9): 661-71.

- Webster, R. P., V. H. Roberts and L. Myatt (2008). "**Protein nitration in placenta - functional significance.**" *Placenta* 29(12): 985-94.
- Weil, M., R. Abeles, A. Nachmany, V. Gold and E. Michael (2004). "**Folic acid rescues nitric oxide-induced neural tube closure defects.**" *Cell Death Differ* 11(3): 361-3.
- Welgus, H. G., E. J. Campbell, Z. Bar-Shavit, R. M. Senior and S. L. Teitelbaum (1985). "**Human alveolar macrophages produce a fibroblast-like collagenase and collagenase inhibitor.**" *J Clin Invest* 76(1): 219-24.
- Welsh, A. O. and A. C. Enders (1985). "**Light and electron microscopic examination of the mature decidual cells of the rat with emphasis on the antimesometrial decidua and its degeneration.**" *Am J Anat* 172(1): 1-29.
- Wentzel, P. and U. J. Eriksson (2002). "**8-Iso-PGF(2alpha) administration generates dysmorphogenesis and increased lipid peroxidation in rat embryos in vitro.**" *Teratology* 66(4): 164-8.
- Wentzel, P., M. Gareskog and U. J. Eriksson (2005). "**Folic acid supplementation diminishes diabetes- and glucose-induced dysmorphogenesis in rat embryos in vivo and in vitro.**" *Diabetes* 54(2): 546-53.
- Wentzel, P., N. Welsh and U. J. Eriksson (1999). "**Developmental damage, increased lipid peroxidation, diminished cyclooxygenase-2 gene expression, and lowered prostaglandin E2 levels in rat embryos exposed to a diabetic environment.**" *Diabetes* 48(4): 813-20.
- Wewer, U. M., A. Damjanov, J. Weiss, L. A. Liotta and I. Damjanov (1986). "**Mouse endometrial stromal cells produce basement-membrane components.**" *Differentiation* 32(1): 49-58.
- White, V., E. Gonzalez, C. Pustovrh, E. Capobianco, N. Martinez, D. F. Do Porto, R. Higa and A. Jawerbaum (2007). "**Leptin in embryos from control and diabetic rats during organogenesis: a modulator of nitric oxide production and lipid homeostasis.**" *Diabetes Metab Res Rev.*
- WHO (2003). **Global Burden of Diabetes.** Bruxelles, International Diabetes Federation.
- Wieser, F., L. Waite, C. Depoix and R. N. Taylor (2008). "**PPAR Action in Human Placental Development and Pregnancy and Its Complications.**" *PPAR Res* 2008: 527048.
- Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree and H. King (2004). "**Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030.**" *Diabetes Care* 27(5): 1047-53.
- Wilhelm, S. M., I. E. Collier, B. L. Marmer, A. Z. Eisen, G. A. Grant and G. I. Goldberg (1989). "**SV40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages.**" *J Biol Chem* 264(29): 17213-21.
- Williams, P. J., J. N. Bulmer, B. A. Innes and F. Broughton Pipkin (2011). "**Possible Roles for Folic Acid in the Regulation of Trophoblast Invasion and Placental Development in Normal Early Human Pregnancy.**" *Biol Reprod.*
- Wisdom, S. J., R. Wilson, J. H. McKillop and J. J. Walker (1991). "**Antioxidant systems in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension.**" *Am J Obstet Gynecol* 165(6 Pt 1): 1701-4.
- Witty, J. P., J. H. Wright and L. M. Matrisian (1995). "**Matrix metalloproteinases are expressed during ductal and alveolar mammary morphogenesis, and misregulation of stromelysin-1 in transgenic mice induces unscheduled alveolar development.**" *Mol Biol Cell* 6(10): 1287-303.
- Woessner, J. F., Jr. (1995). "**Quantification of matrix metalloproteinases in tissue samples.**" *Methods Enzymol* 248: 510-28.
- Won, H. Y., J. B. Park, E. Y. Park and K. D. Riew (2009). "**Effect of hyperglycemia on apoptosis of notochordal cells and intervertebral disc degeneration in diabetic rats.**" *J Neurosurg Spine* 11(6): 741-8.
- Wren, C., G. Birrell and G. Hawthorne (2003). "**Cardiovascular malformations in infants of diabetic mothers.**" *Heart* 89(10): 1217-20.
- Xia, Y., L. J. Roman, B. S. Masters and J. L. Zweier (1998). "**Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain.**" *J Biol Chem* 273(35): 22635-9.
- Xu, H. E., M. H. Lambert, V. G. Montana, D. J. Parks, S. G. Blanchard, P. J. Brown, D. D. Sternbach, J. M. Lehmann, G. B. Wisely, T. M. Willson, S. A. Kliewer and M. V. Milburn (1999). "**Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors.**" *Mol Cell* 3(3): 397-403.
- 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 and 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, K. Y., D. L. Huso, T. M. Dawson, D. S. Bredt and L. C. Becker (1999). "**Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2): 657-62.
- Xu, Y., Q. Wang, T. J. Cook and 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.
- Yagel, S. (2009). "**The developmental role of natural killer cells at the fetal-maternal interface.**" *Am J Obstet Gynecol* 201(4): 344-50.

- Yamashita, K., M. Suzuki, H. Iwata, T. Koike, M. Hamaguchi, A. Shinagawa, T. Noguchi and T. Hayakawa (1996). "**Tyrosine phosphorylation is crucial for growth signaling by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2).**" *FEBS Lett* 396(1): 103-7.
- Yan, C. and D. D. Boyd (2007). "**Regulation of matrix metalloproteinase gene expression.**" *J Cell Physiol* 211(1): 19-26.
- Yang, J., E. A. Cummings, C. O'Connell and K. Jangaard (2006). "**Fetal and neonatal outcomes of diabetic pregnancies.**" *Obstet Gynecol* 108(3 Pt 1): 644-50.
- Yang, T. T. and S. P. Hawkes (1992). "**Role of the 21-kDa protein TIMP-3 in oncogenic transformation of cultured chicken embryo fibroblasts.**" *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(22): 10676-80.
- Yelavarthi, K. K., H. L. Chen, Y. P. Yang, B. D. Cowley, Jr., J. L. Fishback and J. S. Hunt (1991). "**Tumor necrosis factor-alpha mRNA and protein in rat uterine and placental cells.**" *J Immunol* 146(11): 3840-8.
- Yessoufou, A., A. Hichami, P. Besnard, K. Moutairou and N. A. Khan (2006). "**Peroxisome proliferator-activated receptor alpha deficiency increases the risk of maternal abortion and neonatal mortality in murine pregnancy with or without diabetes mellitus: Modulation of T cell differentiation.**" *Endocrinology* 147(9): 4410-8.
- Young, S. L., K. Evans and J. P. Eu (2002). "**Nitric oxide modulates branching morphogenesis in fetal rat lung explants.**" *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282(3): L379-85.
- Youssef, J. and M. Badr (2004). "**Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors in Inflammation Control.**" *J Biomed Biotechnol* 2004(3): 156-166.
- Yu, K., W. Bayona, C. B. Kallen, H. P. Harding, C. P. Ravera, G. McMahon, M. Brown and M. A. Lazar (1995). "**Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids.**" *J Biol Chem* 270(41): 23975-83.
- Yu, Q. and I. Stamenkovic (2000). "**Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis.**" *Genes Dev* 14(2): 163-76.
- Yu, W. H., S. Yu, Q. Meng, K. Brew and J. F. Woessner, Jr. (2000). "**TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix.**" *J Biol Chem* 275(40): 31226-32.
- Zabihi, S., U. J. Eriksson and P. Wentzel (2007). "**Folic acid supplementation affects ROS scavenging enzymes, enhances Vegf-A, and diminishes apoptotic state in yolk sacs of embryos of diabetic rats.**" *Reprod Toxicol* 23(4): 486-98.
- Zhang, J., M. Fu, X. Zhu, Y. Xiao, Y. Mou, H. Zheng, M. A. Akinbami, Q. Wang and Y. E. Chen (2002). "**Peroxisome proliferator-activated receptor delta is up-regulated during vascular lesion formation and promotes post-confluent cell proliferation in vascular smooth muscle cells.**" *J Biol Chem* 277(13): 11505-12.
- Zhang, L. (1997). "**The effects of essential fatty acids preparation in the treatment of intrauterine growth retardation.**" *Am J Perinatol* 14(9): 535-7.
- Zhang, X. and H. A. Young (2002). "**PPAR and immune system--what do we know?**" *Int Immunopharmacol* 2(8): 1029-44.
- Zhang, Y., J. Wada, I. Hashimoto, J. Eguchi, A. Yasuhara, Y. S. Kanwar, K. Shikata and H. Makino (2006). "**Therapeutic approach for diabetic nephropathy using gene delivery of translocase of inner mitochondrial membrane 44 by reducing mitochondrial superoxide production.**" *J Am Soc Nephrol* 17(4): 1090-101.
- Zhao, X., X. Lu and Q. Feng (2002). "**Deficiency in endothelial nitric oxide synthase impairs myocardial angiogenesis.**" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283(6): H2371-8.
- Zhao, Y. G., A. Z. Xiao, X. M. Cao and C. Zhu (2002). "**Expression of matrix metalloproteinase -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinase -1, -2, -3 mRNAs in rat uterus during early pregnancy.**" *Mol Reprod Dev* 62(2): 149-58.
- Zou, M. H., M. Leist and V. Ullrich (1999). "**Selective nitration of prostacyclin synthase and defective vasorelaxation in atherosclerotic bovine coronary arteries.**" *Am J Pathol* 154(5): 1359-65.