



Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Universidad de Buenos Aires

# **Metaloproteinasas durante la maduración de la placenta y la morfogénesis fetal en la patología diabética**

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

**Autor: Lic Maria Carolina Pustovrh  
Director: Dra. Elida González  
Director Asistente: Dr. Juan José López  
Consejero de Estudios: Dra. Cristina Maggese**

**Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, Centro de Estudios  
Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO-CONICET-UBA).  
Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Profesor Eduardo  
De Robertis" Facultad de Medicina, UBA.**

**Buenos Aires, 12 de Diciembre de 2005**

Metaloproteinasas durante la maduración de la placenta y la morfogénesis fetal en la patología diabética

En el presente estudio hemos evaluado los niveles y la actividad de las metaloproteinasas de la unidad feto-placentaria a mediados de la gestación en ratas sanas y diabéticas, etapa en la cual se instaura la función de transporte materno-fetal, y ambas entidades están sufriendo activos procesos de remodelación y de reestructuración tisular en los cuales estas proteasas están implicadas.

Nuestros resultados muestran que los niveles y la actividad de las metaloproteinasas 2 y 9 son más altos en las placentas y los fetos de ratas diabéticas. Asimismo señalan que el medio ambiente materno diabético genera un incremento en los niveles placentarios y fetales de las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno los cuales ocasionan una sobreactivación metaloproteásica.

Nuestros resultados también determinan que la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J<sub>2</sub> (ligando endógeno de los receptores PPAR $\gamma$ ) es un modulador negativo de la expresión y de la actividad de metaloproteinasas 2 y 9 fetales y placentarias, y que la producción de dicho prostanoide es menor en los tejidos provenientes de animales diabéticos con respecto al grupo control.

***Los presentes resultados permiten concluir que las alteraciones evidenciadas en la expresión y actividad de las metaloproteinasas en la unidad feto-placentaria de ratas diabéticas, posiblemente vinculadas con la generación de lesiones placentarias y dismorfogénesis embrionaria características en esta patología, son inducidas, al menos en parte, por desbalances en la producción de agentes moduladores como las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, y agonistas endógenos de PPAR $\gamma$***

Palabras claves: Diabetes, gestación, feto, placenta, metaloproteinasas, especies reactivas del oxígeno, óxido nítrico, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J<sub>2</sub>

## ***Matrix metalloproteinases during the placental maturation and fetal morphogenesis in the diabetic pathology***

In the present study we evaluated matrix metalloproteinases in the feto-placental unit from control and diabetic rats at midgestation. At the studied pregnancy stage the placenta is already functional as regards to the feto-maternal transport. Also, in both the developing fetuses and placentas the active processes of tissular remodeling involve the activity of these proteases.

We found that both levels and activities of matrix metalloproteases 2 and 9 are higher in the fetuses and placentas from diabetic rats when compared to controls. Moreover, we demonstrated that the diabetic environment enhanced, in the feto-placental unit, reactive oxygen and nitrogen species that in turn led to matrix metalloproteinases overactivation.

We also found that 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> (an endogenous PPAR $\gamma$  ligand) negatively regulated both the expression and the activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in fetuses and placentas. Moreover, we found that the levels of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> are reduced in the feto-placental unit from diabetic rats when compared to controls.

The obtained results suggest that the alterations in the expression and activities of matrix metalloproteinases in the feto-placental unit from diabetic rats, probably involved in the abnormal placental and embryonic development frequently found in diabetic pregnancies are, at least in part, a result of the disbalances in the production of several modulatory agents, such as reactive oxygen species, nitric oxide and endogenous PPAR $\gamma$  ligands.

Keywords: Diabetes, gestation, fetus placenta, matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, nitric oxide, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub>

El contenido de esta tesis ha sido parcialmente publicado en:

Increased Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Placenta of Diabetic Rats at Midgestation. (2005). M.C. Pustovrh, A. Jawerbaum, E. Capobianco, V. White, J.J. López-Costa and E. González. *Placenta* 26: 339-348.

Oxidative Stress Promotes the Increase of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 Activities in the Feto-Placental Unit of Diabetic Rats. (2005). M.C. Pustovrh, A. Jawerbaum, E. Capobianco, V. White, N. Martínez, J.J. López-Costa and E. González. *Free Radical Research* 39: 1285-1293.

# AGRADECIMIENTOS

*Deseo expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que con su guía y amistad han posibilitado la realización de esta tesis:*

A los Drs.: Elida González, Juan José López y Alicia Jawerbaum: por su dedicación, confianza y paciencia. Por sembrar en mí sus conocimientos y pasión por la ciencia.

A mis compañeras de laboratorio y amigas, Evangelina Capobianco, María Esther Castro, Elisa Cebal, Cristina Cerquetti, Alicia Faletti, Romina Higa, Nora Martínez, Débora Sinner y Verónica White. Que sin su inmensa ayuda y contención no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A María Esther López por su asistencia y amabilidad en toda ocasión.

A los institutos: IBCyN “Prof E De Robertis” y CEFYBO, por brindarme un lugar donde desarrollar mi tesis doctoral y la oportunidad de formarme en la carrera científica.

De manera especial, a la Universidad de Buenos Aires por su apoyo económico y académico. Bajo el nombre de la institución hago llegar el agradecimiento en forma particular a todos los profesores y ayudantes que con infinita dedicación me formaron primero como alumna y luego como docente, desarrollando en mí un inmenso respeto y cariño por ella.

A mis amigos: Mony, Clau, Maru, Hernán y Sebas. Por acompañarme en un trabajo que no respeta tiempos y por saber ser pilares del corazón.

A mi familia, por su amor y apoyo incondicional.

**A todos: Muchas Gracias**

# Índice

<b>Introducción</b>	1
☞ <b>La unidad feto-placentaria</b>	1
La placenta	1
Desarrollo embrionario	8
Desarrollo del sistema nervioso	9
Médula espinal	12
Desarrollo cardíaco	13
☞ <b>La patología diabética</b>	17
Diabetes tipo 1	18
Diabetes tipo 2	19
Diabetes gestacional	20
Modelos experimentales de diabetes	20
Adaptaciones del metabolismo materno a la gestación	22
Impacto de la diabetes materna	23
☞ <b>Las metaloproteinasas</b>	26
Participación de las MMPs en los procesos reproductivos fisiológicos y patológicos	31
MMPs en la patología diabética	33
☞ <b>Especies reactivas del oxígeno</b>	34
Función biológica de las especies reactivas del oxígeno	36
Estrés oxidativo en la patología diabética	36
☞ <b>El óxido nítrico</b>	38
Función biológica del óxido nítrico	39
El óxido nítrico en la patología diabética	41
☞ <b>PPARs &lt; Receptores activados por factores de proliferación peroxisomal &gt;</b>	43
Función biológica de los PPARs	43
PPARs en la patología diabética	44
<b>Hipótesis</b>	46
<b>Objetivos</b>	46
Objetivo general	46
Objetivos particulares	47
<b>Materiales y métodos</b>	48
<b>Materiales</b>	48
Equipos de determinación colorimétrica	48
Solventes y sales	49
Programas de análisis de imagen	49
Otros	49
Animales	49
<b>Métodos</b>	50
A. Modelo experimental	50
Modelo experimental de diabetes	50
Apareos	50
B. Determinaciones	50
Preparación de los tejidos	50

Determinaciones en suero materno y en líquido amniótico	51
Incubaciones tisulares	51
Inmunolocalización de MMPs y residuos de nitrotirosina	52
Actividad de NADPH diaforasa	53
Análisis de imágenes	54
Determinación de proteínas	54
Detección de la actividad de las MMPs	54
Niveles de TIMPs	56
Niveles de PPAR $\gamma$	56
Niveles de lipoperóxidos	58
Evaluación de la actividad de la enzima catalasa	59
Evaluación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa	59
Cuantificación de nitratos/nitritos	60
Determinación de niveles de 15dPGJ <sub>2</sub>	60
Determinación estadísticas	61
<b>Resultados</b>	<b>62</b>
☞ <b>Características generales del modelo de diabetes moderada a mediados de la gestación</b>	<b>62</b>
<b>Capítulo I</b>	<b>64</b>
☞ <b>Evaluación de las metaloproteinasas en la unidad feto-placentaria</b>	<b>64</b>
Inmunolocalización de las metaloproteinasas placentarias	64
Actividad de metaloproteinasas en el feto	74
<b>Capítulo II</b>	<b>77</b>
☞ <b>Regulación de la actividad de las metaloproteinasas por acción de las especies reactivas del oxígeno en la unidad feto-placentaria</b>	<b>77</b>
Balance oxidativo en la unidad feto-placentaria de ratas control y diabéticas	77
Niveles de lipoperóxidos	77
Actividad de la enzima catalasa	78
Actividad de la enzima superóxido dismutasa	79
Regulación de la actividad de MMP-2 y MMP-9 por las especies reactivas del oxígeno en la unidad feto-placentaria de ratas control y diabéticas	80
<b>Capítulo III</b>	<b>85</b>
☞ <b>Regulación de la actividad de las metaloproteinasas por acción del óxido nítrico en la unidad feto-placentaria</b>	<b>85</b>
Localización de NADPH-diaforasa	85
Evaluación de los niveles de nitratos/nitritos	88
Inmunolocalización de los residuos de nitrotirosina en la placenta de ratas control y diabéticas	89
Regulación de la actividad de MMP-2 y MMP-9 por el óxido nítrico en la unidad feto-placentaria de ratas control y diabéticas	92
<b>Capítulo IV</b>	<b>97</b>
☞ <b>Regulación de la actividad de las metaloproteinasas por 15d-PGJ<sub>2</sub> en la unidad feto-placentaria</b>	<b>97</b>
Niveles del receptor activado por factores de proliferación peroxisomal gamma (PPAR $\gamma$ )	97
Evaluación de los niveles de 15d-PGJ <sub>2</sub>	98
Regulación de MMP-2 y MMP-9 por 15d-PGJ <sub>2</sub> en la unidad feto-placentaria de ratas control y diabéticas	99
Expresión de los TIMPs y su regulación por 15d-PGJ <sub>2</sub> en la unidad feto-placentaria de ratas control y diabéticas	102

<b>Discusión</b>	104
<b>Conclusión</b>	120
<b>Bibliografía</b>	124



# ABREVIATURAS

15d-PGJ<sub>2</sub>: 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J<sub>2</sub>

KRB: Medio Krebs Ringer Bicarbonato

MEC: matriz extracelular

MMPs: Metaloproteinasas de matriz

NO: óxido nítrico

NOS: óxido nítrico sintasa

PBS: buffer fosfato salino

PPARs: receptores activados por factores de proliferación peroxisomal

ROS: especies reactivas del oxígeno

SOD: superóxido dismutasa

TIMPs: Inhibidores Tisulares de las Metaloproteinasas

**Demás abreviaturas son indicadas en el texto**

## ∞INTRODUCCIÓN ∞

*El aspecto más asombroso de la vida, es el tiempo intrauterino, el tiempo de la madre y el feto, que a pesar de que se mantienen en la más íntima relación fisiológica son dos entidades separadas. Sin embargo el feto es totalmente incapaz de sustentarse a si mismo sin el soporte de su madre, está unido a la vida por medio del único órgano formado por dos individuos: la placenta. Es este órgano, el que cumple con la primordial función de proteger el microambiente fetal, el cual hoy reconocemos tan importante como la carga genética propia del feto para el desarrollo exitoso de este nuevo individuo.*

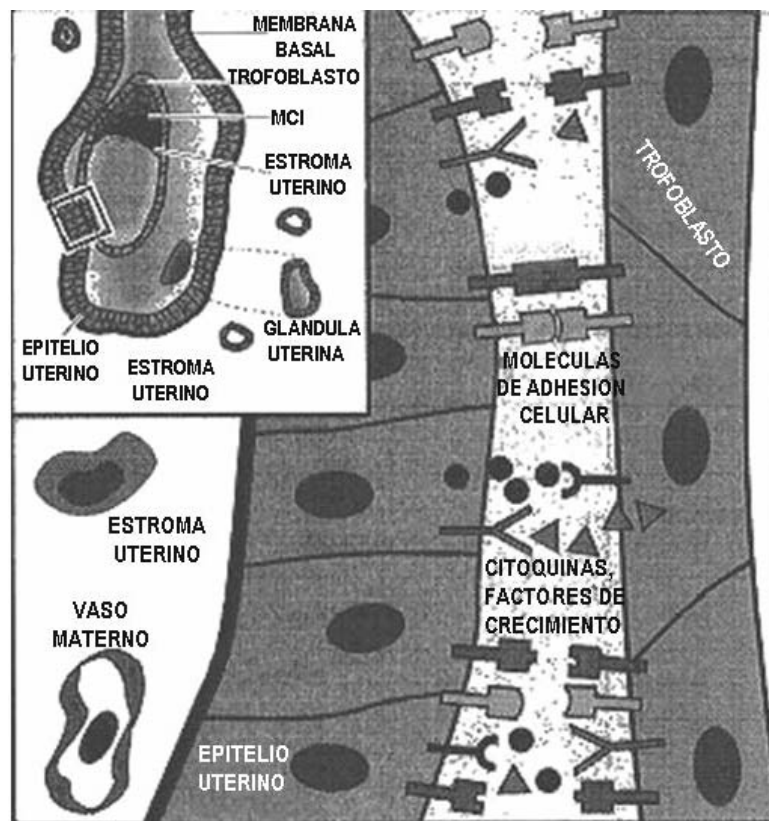
## ∞ LA UNIDAD FETO-PLACENTARIA

### **La placenta**

La placenta es el órgano que vincula el embrión con su madre, el establecimiento de esta conexión es prioritario para el embrión por ser esencial para su subsiguiente desarrollo.

En los roedores, al igual que en los humanos, la placenta es del tipo corioalantoideo, en el cual los tejidos embrionarios invaden el epitelio uterino hasta llegar al estroma del órgano para ponerse en contacto directo con la sangre materna (Abrahamsohn y Zorn, 1993). La natural invasividad de la placenta corioalantoidea sólo puede ser igualada por la de algunos tumores (Kirby, 1965).

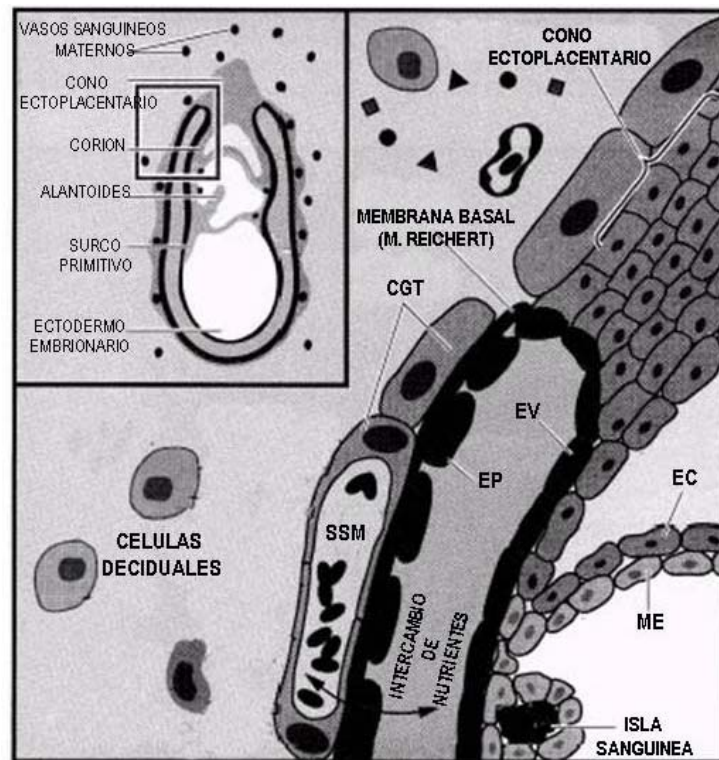
En la rata al día 5.5 de gestación, el blastocisto se une al epitelio uterino materno iniciándose de esta manera el proceso de implantación (Figura I). La capa celular externa del blastocisto, el trofoblasto mural, comienza a diferenciarse en células gigantes del trofoblasto primario. Estas células que poseen características invasivas, comienzan a penetrar el epitelio uterino y a degradar la matriz extracelular hasta tomar contacto directo con la sangre materna.



**Figura I:** Al día 5.5 de preñez ocurre en la rata la aposición de las superficies del trofoblasto y del epitelio endometrial, que va a asegurar el anclaje del blastocisto a la cavidad uterina. Luego, la adhesión de las capas adyacentes, interdigitación de las microvellosidades y formación de los desmosomas entre ambas superficies permiten al blastocisto quedar fijado al tejido materno, para comenzar posteriormente con el proceso de invasión dentro del endometrio uterino. MCI: Macizo celular interno. (Esquema modificado de Cross y col., 1994).

Cuando el sitio de implantación está completamente establecido las células gigantes del trofoblasto en combinación con la membrana de Reichert y el endodermo parietal dan lugar a la formación de la barrera de difusión primitiva, a través de la cual los gases y los nutrientes son intercambiados, sin exponer al embrión de manera directa a la sangre y a el sistema inmune materno. Al mismo tiempo que esto ocurre, las células adyacentes a la masa celular interna, trofoblasto polar, continúan proliferando hasta formar el cono ectoplacentario (Figura II).

Al día 7.5 las células superiores del cono ectoplacentario comienzan a diferenciarse en células invasivas del trofoblasto gigante secundario, la placentación normal depende de la invasión del estroma uterino por parte de estas células. Como respuesta a la unión del trofoblasto al epitelio uterino las células del estroma inmediatamente vecino al sitio de unión comienzan a proliferar y diferenciarse, resultando en la compresión de la luz del útero alrededor del embrión y la formación de la cámara de implantación (Cross y col., 1994; Rinkenberger y Werb, 2000). Una función propuesta para la decidualización, es la protección de la madre a la alta invasividad del embrión, dado que el transplante de un embrión murino fuera de la cavidad uterina, consigue un inmenso crecimiento e invasividad (Kirby, 1965). De esta manera la decidua actúa como una barrera fisiológica que protege al útero de una inapropiada invasión del embrión, por medio de la producción de inhibidores de las enzimas proteolíticas involucradas en el proceso de implantación (Alexander y col., 1996).



**Figura II:** Placenta vitelina en la rata. La cara parietal del saco vitelino, las células gigantes del trofoblasto y la membrana basal denominada membrana de Reichert, forman el principal órgano de transporte en la etapa temprana post-implantatoria. CGT: células gigantes del trofoblasto, EP: endodermo parietal del saco vitelino, EV: endodermo visceral del saco vitelino, EC: ectodermo coriónico, ME: mesodermo extraembrionario. (Esquema modificado de Cross y col., 1994).

Desde los días 8.5 a 12.5 de preñez en la rata se forma la vasculatura fetal que invade el saco vitelino, el cual es el encargado del intercambio de gases y nutrientes al embrión en desarrollo, antes de la formación de la placenta corioalantoidea, proceso que comienza a desarrollarse el día 9 de gestación. Al día 12 de preñez 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 los espongiotrofoblastos, y limitada por una capa discontinua de células gigantes del trofoblasto que aíslan al embrión de la **decidua materna**.

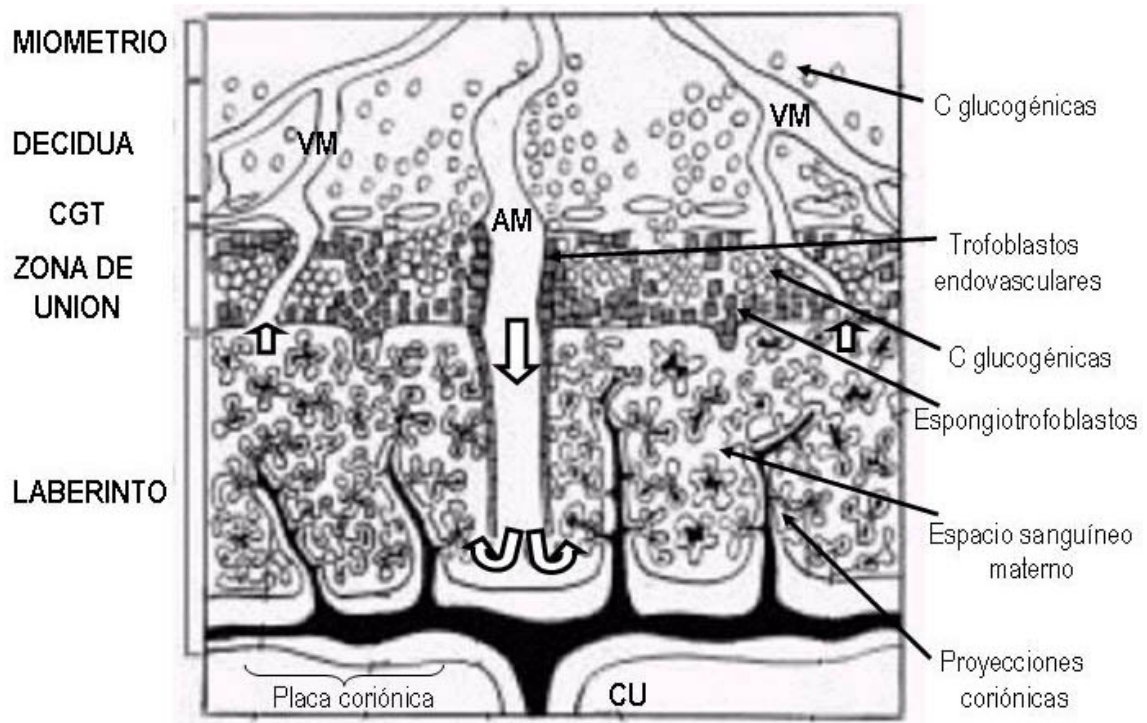
Es en la zona del **laberinto placentario** donde la circulación materna y fetal se encuentra en estrecha proximidad y donde el intercambio gaseoso y de nutrientes tiene lugar. Esta región está limitada hacia el lado del feto por la **placa coriónica** en la cual se inserta el cordón umbilical, y las arterias y venas fetales originadas desde el mesénquima del alantoides se ramifican formando las proyecciones de la placa coriónica. Estas ramificaciones están compuestas por endotelio fetal y tres capas de trofoblastos, encontrándose hacia la circulación materna una capa de trofoblastos unicelulares (citotrofoblastos) seguida por dos capas de trofoblastos multinucleados (sinciotrofoblastos). Estas tres capas, sin embargo funcionan como una sola, dado que la primera capa de citotrofoblastos es discontinua y la segunda capa se une a la tercera por medio de uniones estrechas (Alexander y col., 1996; Georgiades y col., 2002). Estas células que están especializadas para el transporte (Enders y Blankenship, 1999), constituyen la interfase hemocorial, que permite el intercambio entre la circulación materna y fetal. Al día 12.5 la presencia de los glóbulos rojos fetales (que se diferencian de los eritrocitos maternos por presentar mayor tamaño y la retención del núcleo) en la zona del laberinto indica que la circulación placentaria ha comenzado.

La **zona de unión**, es la región subsiguiente al laberinto, está constituida por citotrofoblastos pero no posee circulación fetal, estos trofoblastos tienen alta capacidad invasiva y son productores de hormonas. Los trofoblastos de esta zona tienen acceso directo a la sangre materna. En la rata, los citotrofoblastos se diferencian en espongiotrofoblastos y células glucogénicas, las cuales deben su nombre a la propiedad de almacenar altas cantidades de glucógeno. Las células glucogénicas aparecen en la placenta alrededor del día 13 de preñez, son muy invasivas y en la placenta madura se las encuentra formando grupos delimitados por los espongiotrofoblastos. Hacia el final de la gestación su número decae abruptamente. Aún no está claro si esta dramática desaparición es debida a procesos que involucran muerte celular o la gradual migración hacia la decidua, o bien una combinación de ambos eventos (Redline y col., 1993; Teesalu y col, 1998).

Esta región de la placenta es una importante productora de las hormonas lactógeno placentaria I y II (Malassiné y col., 2003). Dichas hormonas son liberadas de manera directa a la circulación materna redireccionando el sistema endócrino materno caracterizando el medio hormonal que gobierna los cambios necesarios para el desarrollo de la preñez (Cross y col., 1994; Soares y col., 1996).

Inmediatamente bordeando la zona de unión de la placenta de rata, se encuentra una capa discontinua de **células gigantes del trofoblasto**. Estas células son conocidas como los trofoblastos gigantes secundarios y derivan del trofoblasto polar. No está claro aún si una zona análoga se encuentra presente en la placenta humana (Georgiades y col., 2002). Por último, se encuentra la zona de tejido uterino modificado que constituye la cara materna de la placenta. Esta región es progresivamente invadida por los trofoblastos, creando la interfase materno-fetal importante para el desarrollo de la función placentaria. Este tejido uterino se denomina '**decidua basalis**' y se encuentra limitado por las células trofoblásticas y el miometrio, situado inmediatamente a continuación de la decidua basalis. Las células glucogénicas de la zona de unión invaden la arteria uterina materna, presente en esta región, y esta invasión produce modificaciones en la constitución de la pared vascular, aumentando el flujo sanguíneo y bajando la resistencia (Kaufmann y col, 2003) (Figura III).

*Cada una de estas zonas que componen la placenta definitiva, no permanecen estáticas durante la gestación, sino que cambian constantemente para aumentar la eficiencia de su funcionamiento. Durante el embarazo la placenta aumenta su capacidad funcional sin un crecimiento proporcionado del órgano.*



**Figura III:** El esquema muestra la placenta definitiva de la rata con las tres zonas que la constituyen: laberinto, zona de unión y decidua. VM: vena materna, AM: arteria materna, CGT: células gigantes del trofoblasto, CU: cordón umbilical. Las flechas indican el sentido de la circulación placentaria. (Esquema modificado de Georgiades y col., 2002).

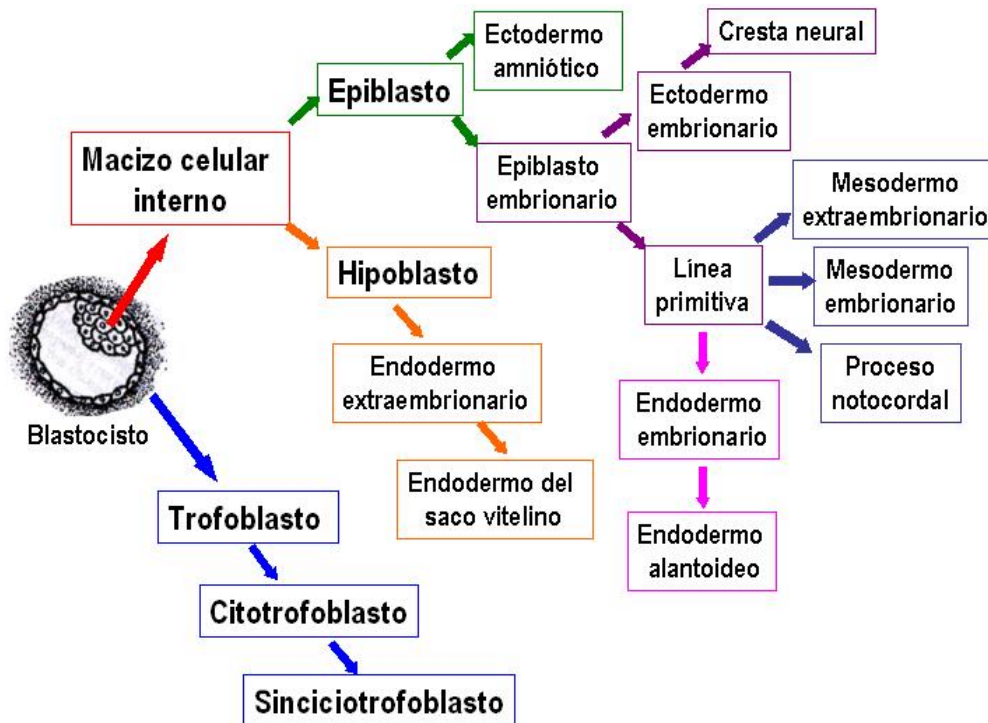
**Fallas en la implantación o en el establecimiento de una placenta funcional resultan en la muerte y reabsorción del embrión. Las malformaciones placentarias repercuten en retardo del crecimiento intrauterino y en el nacimiento de neonatos con bajas posibilidades de supervivencia. Es debido a las limitaciones para realizar estos seguimientos en los humanos que los modelos animales adquieren alta importancia para el estudio de la gestación, por lo cual aún queda mucho por comprender acerca de la etiología de las alteraciones placentarias que causan complicaciones durante el embarazo patológico, como el aborto espontáneo, diabetes gestacional, pre-eclampsia y retardo en el crecimiento intrauterino.**



### **Desarrollo embrionario**

El desarrollo embrionario comienza con el evento de fecundación, luego el embrión en las etapas iniciales se divide hasta llegar al estadio de mórula. A medida que las células continúan dividiéndose, se forma una cavidad llena de fluido en el centro del embrión originando el blastocisto. El **blastocisto** está formado por dos tipos de células, las que componen el macizo celular interno, que darán origen al embrión propiamente dicho y el trofoblasto que rodea completamente al embrión en desarrollo y es el principal precursor de la placenta. Al implantarse 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: la cavidad amniótica; algunas células del epiblasto se diferencian a amnioblastos que formarán la **membrana amniótica**. Células del hipoblasto se transforman en endodermo extraembrionario y sufren dos ondas de migración, la primera recubre la cavidad del blastocisto dando origen al saco vitelino primario, la segunda onda transforma al saco vitelino primario en el **saco vitelino** definitivo (Cross y col., 1994). Luego la cavidad coriónica (celoma extraembrionario) es producida en conjunto con el desarrollo del mesodermo extraembrionario, que se forma entre el saco vitelino y el citotrofoblasto, derivado del trofoblasto embrionario.

Con la aparición de la línea primitiva en el epiblasto del embrión bilaminar comienza el proceso de gastrulación que dará origen al embrión trilaminar, también se establece en este momento el eje cráneo-caudal y la simetría bilateral. 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 IV).



**Figura IV:** Linajes celulares y tisulares del embrión. (Esquema modificado de Carlson.; 2000).

Una vez que la placenta definitiva está establecida y culminada la etapa de organogénesis comienza una nueva etapa embrionaria, la **etapa fetal**. En este período la mayoría de los órganos adquieren su conformación, estructura y función definitiva. El proceso incluye incremento y decremento de la tasa de crecimiento y división celular, cambios en la adhesión celular, la deposición de materia extracelular y cambios en la configuración celular (Gumbiner, 1992; Hotary y col., 2000; Simian y col., 2001).

A continuación se describe el desarrollo de los dos sistemas mayoritarios en importancia, el sistema nervioso y el sistema cardíaco.

### **Desarrollo del sistema nervioso**

En la línea media dorsal del ectodermo embrionario muy tempranamente se forma un engrosamiento que se denomina **placa neural**, primer vestigio del sistema nervioso. Al avanzar el desarrollo del embrión esta placa se deprime originándose el **surco neural**

que al proseguir la depresión forma el canal neural y finalmente al unirse los dos bordes de dicho canal se forma el **tubo neural**. Antes de que se cierre el canal neural, de sus bordes se desprenden células que emigran en dirección ventral del cuerpo embrionario formando la denominada **cresta neural**, estas células darán origen a los huesos de la cara, los ganglios raquídeos, simpáticos, parte de las meninges y los melanóforos que dan el color a la piel (Gilbert, 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**.

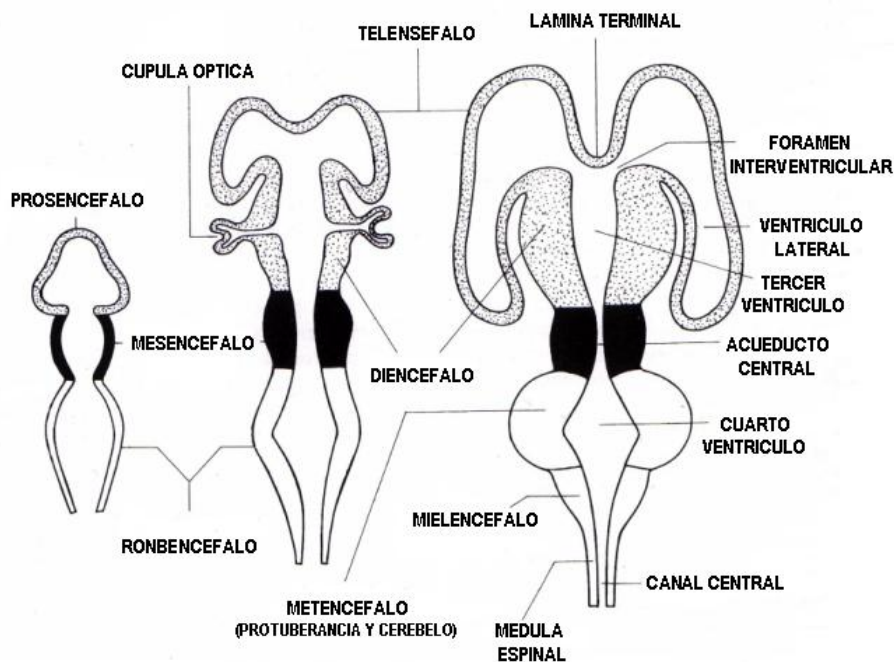
La primera evidencia de las tres subdivisiones del cerebro primitivo es la distribución del lumen neural en tres vesículas, el prosencéfalo, mesencéfalo y el rombencéfalo. Posteriormente la vesícula del cerebro anterior se subdivide originando el telencéfalo, formado por dos ventrículos unidos por el foramen interventricular, y el diencéfalo en posición caudal. El mesencéfalo, que se encuentra doblado en un ángulo en la curvatura cefálica permanece sin dividirse y conserva la forma tubular en su estructura general. El techo del rombencéfalo se adelgaza y aparecen los primeros indicios de subdivisión del mismo en metencéfalo y mielencéfalo. Estas cinco subdivisiones del encéfalo primitivo representan una organización fundamental que persiste hasta la edad adulta (Carlson, 2000).

Las posteriores reestructuraciones del encéfalo primitivo establecerán que el lumen de las vesículas cerebrales dé origen a los ventrículos. Así, el lumen de las vesículas prosencefálicas formarán los ventrículos laterales, el lumen del diencéfalo al tercer ventrículo, el de la vesícula mesencefálica, el acueducto cerebral (o de Silvio) y el lumen del rombencéfalo se transformará en el cuarto ventrículo. Todos estos ventrículos están conectados y continúan con el canal central de la médula espinal o conducto del epéndimo.

La región posterior del prosencéfalo forma el diencefalo, parte de él se asocia al nervio óptico y el resto se diferencia alrededor del **día 13.5** de gestación en el tálamo, epítalamo e hipotálamo. Las partes anteriores laterales del prosencéfalo que devienen en el tejido telencefálico, formarán posteriormente la corteza cerebral y su parte inferior más rostral se asociará al nervio craneal olfatorio y formará el bulbo olfatorio.

El mesencéfalo es la región más pequeña del cerebro primitivo y su región más rostral cumple el rol de procesar las señales que recibe de los nervios oculomotor (III) troclear (IV) y trigémino (V). El mesencéfalo persiste en el adulto y en él se localizan importantes núcleos (entre ellos el núcleo rojo, la sustancia nigra y los núcleos del rafe).

El metencéfalo dará origen en el **día 14** de gestación a la protuberancia y el cerebelo. La protuberancia permite el paso de las fibras nerviosas desde la médula espinal a los centros superiores del encéfalo y en su madurez contiene los núcleos de los nervios VI, VII y VIII. El cerebelo es el componente más moderno del encéfalo desde el punto de vista filogenético; es la principal parte motora del cerebro involucrada en el mantenimiento del equilibrio y la coordinación de la acción muscular. Finalmente el mielencéfalo, la subdivisión más caudal del rombencéfalo, se convierte en el bulbo raquídeo del encéfalo adulto, y en él se localizan las terminales de los nervios IX al XII (Kaufman y Bard, 1999) (Figura V).



**Figura V:** Desarrollo del sistema nervioso. (Esquema modificado de Kaufman y Bard, 1999).

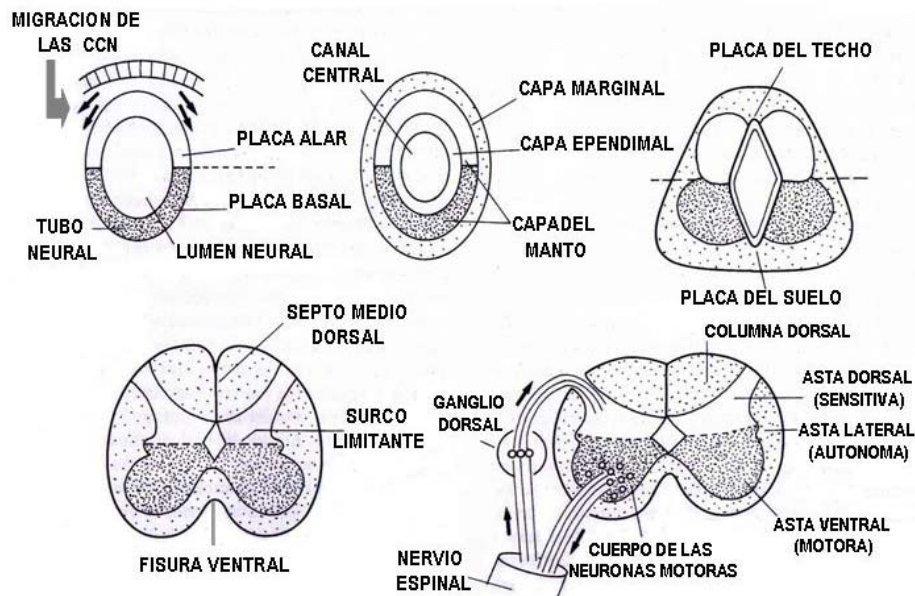
### Médula espinal

La parte rostral del cordón espinal se continúa con la parte caudal del cerebro posterior y su lumen, el canal espinal, se continúa con el lumen del cuarto ventrículo.

La segmentación de los nervios espinales comienza alrededor de los días **11.5 a 12** de gestación, mientras que el tronco del sistema nervioso periférico es observable a partir del día **12.5**. La formación de las capas endodimaria, manto y marginal que derivan del tubo neural y la aparición de los núcleos alares y basales ocurre alrededor de los días **13-14.5** mientras que el techo y el piso aparecen en el día **15.5**. A medida que estas estructuras se van desarrollando, el tubo neural caudal se llama **médula espinal**.

A medida que madura la médula espinal, la zona endodimaria se convierte en la sustancia gris, en la cual están localizados los cuerpos de las neuronas. La zona marginal recibe el nombre de sustancia blanca a causa del color que le dan los numerosos tractos de fibras nerviosas mielinizadas que pasan por esa capa. Una vez que las capas básicas de la médula espinal se han establecido es posible reconocer el **surco limitante**, que

divide la médula en la **placa alar** dorsal y la **placa basal** ventral. Las placas alares derecha e izquierda están unidas por la **placa del techo** y las dos láminas basales están unidas entre sí por la **placa del suelo**. La placa basal representa el componente motor de la médula espinal, los axones que se originan en ella salen de la médula espinal convertidos en las raíces motoras de los nervios espinales. La placa alar, es la región en la cual hacen sinapsis los axones procedentes de los ganglios raquídeos, por lo tanto está asociada con las funciones sensitivas (Carlson, 2000) (Figura VI).



**Figura VI:** Desarrollo de la médula espinal. CCN: células de la cresta neural. (Esquema modificado de Kaufman y Bard, 1999).

### Desarrollo cardíaco

A partir de la **placa lateral mesodérmica esplácnica** se forma una estructura en forma de herradura hueca que constituye la **región cardiogénica**. Esta región contiene dos tubos endocardiales, que se fusionan ventralmente al tubo endodérmico que constituirá el tubo digestivo. La fusión de los tubos endocardiales forma un único compartimiento,

se genera así una cámara que tiene actividad pulsátil aún antes de asumir su función como bombeadora de sangre. El mesodermo esplácnico, recubre el endotelio 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**. La región cefálica del mismo originará los arcos aórticos y 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. La temprana función del corazón aún cuando no está totalmente formado, obedece a las necesidades embrionarias de nutrición, transporte y excreción. A medida que la masa celular aumenta y las estructuras se complejizan, la difusión a través del saco vitelino no es suficiente y el embrión requiere de una estructura capaz de satisfacer sus necesidades cada vez mayores.

Poco después de que se forma el corazón tubular, comienza a evidenciarse una estructura característica en forma de S que indica el inicio de su organogénesis. El corazón primitivo rota, se remodela y se tabica transformándose de un simple tubo al corazón definitivo de cuatro cámaras. Inicialmente el corazón primitivo está constituido por el **seno venoso**, **la aurícula primitiva**, **el ventrículo** y **el bulbo cordis**. La parte inferior del bulbo cordis se diferencia posteriormente en el ventrículo derecho, mientras que el ventrículo primitivo se transforma en el ventrículo izquierdo. La parte superior del bulbo cordis formará el cono cordis y el tronco arterioso (que será la salida del flujo sanguíneo de ambos ventrículos), la aorta ascendente y el tronco pulmonar. La sangre venosa entra inicialmente en el seno venoso a través de un par simétrico de venas cardinales. Los cambios producidos en el sistema venoso rápidamente fuerzan el retorno del sistema venoso hacia la derecha, por lo tanto toda la sangre del cuerpo y de las venas umbilicales entra por la futura aurícula derecha a través del desarrollo de las venas cavas inferior y superior. El cuerno izquierdo del seno venoso se transforma en el **seno**

**coronario** que irriga el miocardio. Luego el cuerno derecho del seno venoso y el *ostium* de la vena cava son incorporados gradualmente a la pared posterior de la aurícula derecha, mientras que, por incorporación de la porción proximal de las venas pulmonares se forma la aurícula izquierda. Luego, el septo *primum* y el septo *secundum* crecen hasta separar la aurícula derecha de la izquierda, pero manteniendo la conexión directa entre las dos aurículas. Esto determina la presencia de cortocircuitos circulatorios a nivel del corazón en desarrollo que mantiene una carga sanguínea equilibrada en todas las cámaras cardíacas posibilitando que la mayoría de la sangre circulante no tenga que pasar por el circuito pulmonar, con desarrollo más tardío.

Luego las válvulas bicúspide (mitral) y tricúspide son formadas y el corazón comienza a remodelarse para dejar las aurículas y el ventrículo en la correcta alineación con sus respectivas salidas circulatorias. La base del bulbo cordis se expande y el septo muscular ventricular (*septum inferius*) separa parcialmente el ventrículo. En los últimos días de gestación, el tracto de salida del corazón sufre los procesos de septación y división. Ocurre la separación de la aorta ascendente del tronco pulmonar, formación de la válvula semilunar y finaliza la tabicación ventricular (Kaufman y Bard, 1999) (Figura VII).





## ☞ LA PATOLOGIA DIABETICA

La diabetes es uno de los principales problemas de salud en el mundo. En el continente americano, el número de personas que padecen esta enfermedad se estima en 35 millones, de las cuales 19 millones (54%) viven en América Latina y el Caribe (King y col., 1998). Más aún, las proyecciones indican que en el 2025 la cantidad de personas diabéticas en América ascenderá a 64 millones, de las cuales 40 millones (62%) corresponderán a América Latina y el Caribe. La diabetes incrementa el riesgo de muerte prematura, particularmente porque está asociada a un mayor riesgo de complicaciones cardiovasculares. Las personas diabéticas presentan además un mayor riesgo de padecer trastornos visuales, enfermedad renal y amputaciones de miembros inferiores. La embarazada diabética tiene significativamente incrementado el riesgo inherente a un deficiente control metabólico. Asimismo se acrecienta en forma significativa el índice de malformaciones congénitas y de otras alteraciones en sus descendientes. Adicionalmente, el impacto originado en la mala programación intrauterina se verá reflejado en un aumento en la incidencia de enfermedades cardiovasculares o metabólicas en períodos posteriores de la vida del neonato.

La diabetes, especialmente cuando está mal controlada, representa una carga económica importante para el individuo y la sociedad, asimismo implica un alto costo personal y familiar por las consecuencias emergentes del cuidado del enfermo y de las complicaciones que induce esta patología en la gestante y su descendencia. El bajo nivel de ingreso en amplios sectores de nuestra población disminuye la probabilidad de un acertado diagnóstico e influye en la calidad de la educación que recibe el enfermo y su entorno, en lo apropiado del tratamiento y en el acceso al mismo. De este panorama surge la necesidad de hacer frente a estas falencias, formulando estrategias y programas de prevención y control de la diabetes en todo el mundo. Desde la investigación básica, consideramos que nuestros esfuerzos deben centrarse en el estudio y el esclarecimiento

de mecanismos de daño inducido por la diabetes, a fin de proveer evidencias para el diseño de futuras conductas terapéuticas que minimicen el impacto de esta enfermedad. La hiperglucemia inherente a esta patología origina un incremento en el estrés oxidativo con altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS), que superan la capacidad antioxidante del organismo, generando diferentes grados de daño en los tejidos. Por otro lado, la hipoinsulinemia implica una disminución de la tasa anabólica y un incremento en los procesos catabólicos, en detrimento de los procesos adipogénicos y glucogenogénicos. Estas alteraciones producen, por un lado, un incremento adicional de la glucemia por gluconeogénesis hepática (Efendic y col., 1985), y por otro, un aumento en la lipólisis y en los ácidos grasos circulantes (Bonadonna y De Fronzo, 1991; McGarry, 2002), y un incremento en la tasa de oxidación de los mismos. Los compuestos intermedios de dichos procesos metabólicos alternativos generan múltiples disfunciones, entre las que se destaca un desacople en la función mitocondrial, que afecta la cadena respiratoria y el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Boucher y col., 2004).

### **Diabetes tipo 1**

La diabetes tipo 1 está causada por un proceso autoinmune que destruye las células beta pancreáticas, pudiendo encontrarse autoanticuerpos en el 85-90% de los pacientes en los que se detecta hiperglucemia por primera vez. Como resultado de la afectación inmunológica, disminuye la capacidad de producir insulina.

Progresivamente, se puede comprobar hiperglucemia, inicialmente en ayunas y posteriormente, de forma permanente. Los individuos susceptibles pueden ser detectados por la presencia de diversos marcadores inmunológicos, así como por estudios que demuestran la pérdida progresiva de la capacidad secretoria de las células beta, circunstancia que origina una insulino-dependencia parcial que se vuelve absoluta con el paso del tiempo. Los sujetos considerados como de alto riesgo para desarrollar diabetes pueden ser identificados mediante detección de marcadores inmunológicos, como la determinación del antígeno leucocitario humano (HLA) (Zonana y Rimoin, 1976), la

detección de anticuerpos contra las células insulares (ICA) o contra la insulina (AAI) (Srikanta y col., 1986). La consecuente reacción autoinmune, que incluye el reconocimiento de las células beta por una población linfocitaria T activada, trae aparejado un proceso inflamatorio donde participan elementos de la sangre que son responsables de la producción de sustancias pro-inflamatorias entre las cuales figuran diversas citoquinas y altos niveles de óxido nítrico (NO), a consecuencia de la inducción de su enzima de síntesis en los islotes pancreáticos (Pukel y col., 1988; González y col., 2001a).

### **Diabetes tipo 2**

Se caracteriza por resistencia a la insulina y por células beta "disfuncionales". Las cantidades totales de insulina secretada pueden estar aumentadas, disminuidas o ser normales en comparación con el animal normal en ayuno. Independientemente, esa cantidad de insulina es insuficiente para superar la resistencia a la misma en los tejidos periféricos (Ward y col., 1984; Calvillán y col., 1991). Los pacientes diabéticos tipo 2 pueden ser o no insulino-dependientes, dependiendo de la gravedad de la resistencia a la insulina y del estado funcional de las células beta. En este tipo de patología parece ser determinante el factor ambiental, y está estrechamente vinculada con el sedentarismo, la alimentación, el índice de masa corporal y la exposición a situaciones de estrés físico o psíquico (Efendic y col., 1984; Surwitt y Feinglos, 1988; Klein y col., 2004). En períodos recientes se ha puesto de manifiesto la importancia de mecanismos vinculados con la mala programación intrauterina como factores predisponentes al padecimiento de la enfermedad, ya que la hiperglucemia materna es capaz de producir alteraciones en los ejes endocrinos fetales, las cuales aumentarán la predisposición a padecer diabetes tipo 2, hipertensión, diferentes desajustes cardiovasculares u obesidad en distintas etapas de la vida postnatal (Aerts y Van Assche, 2003). La enfermedad se caracteriza por diversas alteraciones vinculadas con la unión de la insulina a su receptor y por defectos en los propios mecanismos de producción de la hormona, a su vez relacionados con la cantidad

o la eficiencia de los receptores de glucosa en el páncreas endócrino (Unger y Grundy, 1985; Comi y col., 1987; Brillon y col., 1989).

### **Diabetes gestacional**

Durante la gestación, las hormonas placentarias producen un redireccionamiento del metabolismo materno, orientado hacia la supervivencia fetal. Estos cambios implican un incremento en la producción de insulina por parte del páncreas endócrino y un incremento en la resistencia periférica a esta hormona, lo cual redundo en un mejor aporte de glucosa hacia el feto en desarrollo. Estos mecanismos son muy importantes, ya que la glucosa es el combustible de elección para los tejidos fetales, pero implican una sobreexigencia para el páncreas endócrino de la gestante. Por esa razón el embarazo desencadena la patología diabética en muchas mujeres cuyo páncreas no había manifestado anteriormente su disfuncionalidad. Estas pacientes pueden revertir dicho proceso después del parto, pero evidencian una alta predisposición a desarrollar diabetes tipo 2 de cinco a diez años posteriores al mismo. 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).

### **Modelos Experimentales de Diabetes**

El estudio de la diabetes mellitus, principalmente aquellas evaluaciones relacionadas con las alteraciones de la gestante diabética, hacen imprescindible la utilización de modelos experimentales desarrollados en animales. Aquellos obtenidos en roedores son los más extensamente utilizados. Existen manipulaciones genéticas que originan cepas en las que se desarrolla diabetes espontánea, o bien ésta se obtiene por intervenciones quirúrgicas que incluyen la ablación parcial o total del páncreas endocrino.

La inducción química de la patología ha sido ampliamente utilizada por diversos grupos de trabajo en todo el mundo. La administración de estreptozotocina, un antibiótico

aislado de *Streptomyces Achromogenes*, ha sido usada en forma preferencial (Mc Neill, 1999), ya que, dada su estructura química que incluye una 2-deoxi glucosa en su cadena lateral, posee una alta especificidad para unirse a los receptores de las células beta pancreáticas. Dicha unión genera metilación de las bases del ADN nuclear, induciendo una elevada actividad de su enzima reparadora, la poliADP ribosa sintetasa, que utiliza como cofactor al  $\text{NAD}^+$ . La depleción subsecuente de este compuesto, conjuntamente con la sobreproducción de agentes oxidativos y nitrosativos, lleva a la muerte de las células beta de los islotes (Junod y col., 1967; Orci y col., 1968).

La administración de estreptozotocina a una rata adulta produce la destrucción del páncreas endócrino en un período que oscila entre las 48 a 72 hs posteriores. El cuadro se acompaña con hiperglucemias severas e hipoinsulinemia marcada, cetoacidosis, polidipsia y poliuria, y trae aparejada profundas fallas en el mantenimiento del ciclo estral luego de los 10-15 días subsiguientes a la administración (Junod y col., 1969; Sambandan y col., 2000). En estas condiciones, los animales se vuelven insulino-dependientes.

Un segundo modelo, muy utilizado en los estudios que involucran el seguimiento de la preñez y la evaluación de las alteraciones originadas por la diabetes en el desarrollo embrionario y placentario, se logra mediante la administración de estreptozotocina subcutánea en período neonatal (Portha y col., 1979). A las 24-48 hs de vida, el páncreas neonatal conserva una porción indiferenciada, que permite la regeneración parcial del órgano luego de la destrucción de los islotes originada por la droga. El animal adulto mostrará parámetros compatibles con una diabetes moderada, con hiperglucemias que oscilan entre los 150 y los 230 mg/dl, insulinemia ligeramente disminuida y ausencia de cetoacidosis. Sin embargo, estas ratas son fuertemente intolerantes a la sobrecarga de glucosa. Este modelo resulta de gran utilidad por la posibilidad de analizar en detalle el desarrollo embrionario y de los tejidos placentarios de los animales gestantes, y por presentar niveles de glucemia compatibles con aquellos frecuentemente hallados en pacientes diabéticas, aún bajo intervención terapéutica.

### **Adaptaciones del metabolismo materno a la gestación**

La gestación induce una serie de cambios metabólicos necesarios para satisfacer los requerimientos del embrión en desarrollo (Freinkel, 1980). Estos cambios serán comandados por la acción de las hormonas: gonadotrofina coriónica (hCG), lactógeno placentaria (LP), prolactina, progesterona, estrógenos y cortisol.

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

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

La hCG se sintetiza en la placenta humana. Es producida por los citotroblastos y su

expresión aumenta cuando éstos se diferencian a trofoblastos sincitiales (Merz, 1994). Si bien su principal función es la regulación de la producción hormonal, tiene algunos efectos sobre el metabolismo placentario, estimulando la glucogenolisis y la glucólisis placentaria. (Demers y col., 1973; Diamant y col., 1975 b; Ryan y Enns, 1988)

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

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

### **Impacto de la diabetes materna**

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

Cabe destacar que en la gravidez diabética el estrés oxidativo generado por la hiperglucemia, junto con las anomalías hormonales, sumadas a las metabólicas y al



desequilibrio de sustancias vasoactivas son todos mecanismos involucrados en las múltiples anomalías inducidas por esta patología que se observan en el curso de la gestación humana y en los modelos experimentales de diabetes.

El riesgo de abortos espontáneos, malformaciones congénitas, alteraciones en el proceso de maduración pulmonar, hipoglucemia neonatal y macrosomía, se encuentran incrementados en la gestación diabética. La hiperglucemia, junto con la hiperlipidemia y la producción incrementada de cuerpos cetónicos son teratógenos cuyos mecanismos aún no han sido del todo detallados. La incidencia de estas anomalías embrionarias disminuye con el tratamiento insulínico, si bien no se ha logrado aún revertir completamente. Es por esto que el buen control glucémico antes y durante el embarazo es fundamental para el correcto desarrollo del embrión (Banerjee y col., 2004).

Las principales malformaciones inducidas por la diabetes son el resultado de alteraciones durante el cierre del tubo neural, que desencadena patologías como la espina bífida, diversos grados de anencefalia, así como otras alteraciones en el desarrollo y función del sistema nervioso central. Asimismo son importantes las fallas en el desarrollo cardíaco, en la formación de la mandíbula y maxilar y otras dismorfogénesis del esqueleto (Reece y col., 1985; Styurd y col., 1995; Molin y col., 2004).

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

la diabetes (Giugliano y col., 1996). Se ha comprobado que el agregado de antioxidantes al medio de cultivo de embriones en condiciones de hiperglucemia disminuye la incidencia de malformaciones (Eriksson y Siman, 1996; Wentzel y Eriksson, 1998). Por otra parte, en embriones pre-implantatorios, la hiperglucemia provoca la apoptosis de células del blastocisto, particularmente en aquellas de la masa interna celular, que dará lugar al embrión (Moley, 2001; Chi y col., 2002). Se evidencia también daño apoptótico en el embrión durante la etapa de organogénesis temprana (Fine y col., 1999).

Si bien el período de organogénesis temprana es el de mayor susceptibilidad a la inducción de malformaciones congénitas, las anomalías inducidas por la diabetes luego de la placentación dan lugar también a alteraciones que estarán vinculadas al distrés respiratorio fetal y la macrosomía, y que podrán comprometer la génesis 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 las placentas. Shafrir ha descripto un aumento del tamaño y del contenido de glucógeno en las placentas de rata diabética (Shafrir y Barash, 1991), mientras que estudios a nivel morfológico de la estructura placentaria revelaron un aumento en el grosor de la superficie de las vellosidades y acumulación del contenido de glucógeno en las células trofoblásticas de las vellosidades (Padmanabhan y Shafiullah, 2001). Las anomalías estructurales presentes en las placentas diabéticas alteran el normal funcionamiento del órgano. El transporte de nutrientes se dificulta debido a la disminución del volumen de sangre materna que entra en la placenta, el aumento en el espesor de las capas trofoblásticas y la fibrosis de los capilares. La distancia que debe cubrir el proceso de transporte bilateral aumenta y probablemente por esta causa, se observa una disminución en el flujo sanguíneo placentario (Eriksson y Jansson, 1984). Esta disminución compromete el normal desarrollo fetal, observándose en muchos casos un significativo retraso de crecimiento. Si bien el tratamiento con insulina disminuye la frecuencia de aparición de anomalías placentarias, no las elimina por completo. (Padmanabhan y

Shafiullah, 2001). En este sentido la placentomegalia podría ser una adaptación tendiente a aumentar la superficie de intercambio, para compensar la disminución del flujo sanguíneo, y por lo tanto, disminución del transporte de nutrientes y oxígeno. Por otra parte, la hiperglucemia estimularía la división mitótica, favoreciendo la proliferación en detrimento de la diferenciación trofoblástica. En efecto, el aumento de las células de glucógeno, del grosor trofoblástico y de las figuras mitóticas caracteriza la inmadurez placentaria inducida por la diabetes (Gewolb y col., 1986).

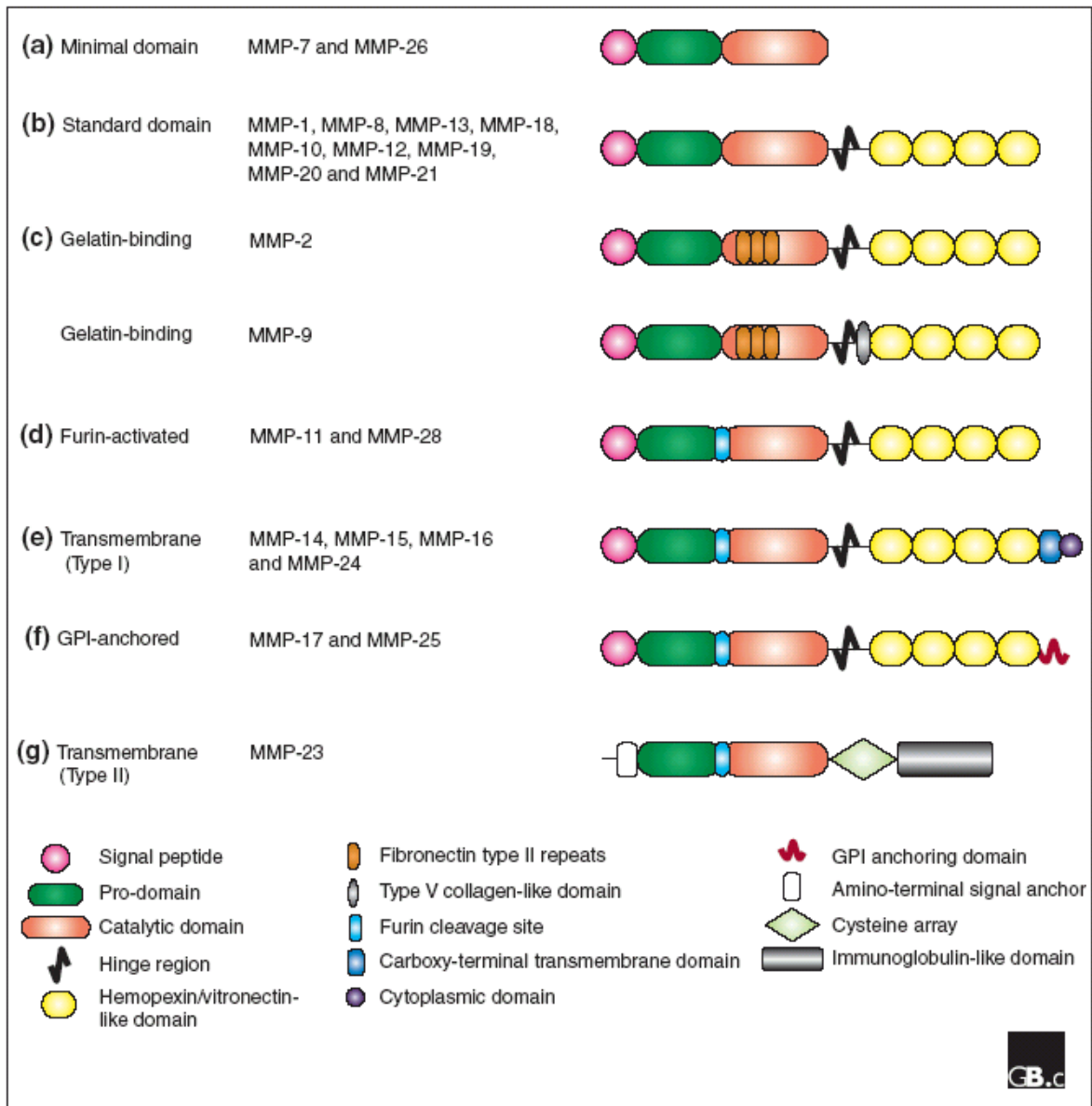
## ∞ LAS METALOPROTEINASAS

Las macromoléculas que componen la **matriz extracelular** (MEC) son importantes para crear el microambiente que las células requieren durante el desarrollo de la unidad fetoplacentaria. Las **metaloproteinasas** (MMP) son una familia de proteasas que participan en la degradación de la MEC (Nagase y Woessner, 1999). Actualmente se encuentran descritas más de 30 MMPs en vertebrados de las cuales 27 están presentes en el humano (Folgueras y col., 2004). Por mucho tiempo se consideró a la MEC como una estructura pasiva, que brindaba anclaje y soporte mecánico a las células, y a las proteasas extracelulares como simples remodeladoras de la matriz extracelular. Actualmente se conoce que la MEC es una estructura activa que contiene factores de crecimiento, proteínas de unión y otras biomoléculas, como así también sitios de unión de moléculas de superficie celular que solamente son expuestas después de sufrir proteólisis. De este modo, las proteasas responsables del recambio de la MEC contribuyen de manera dinámica a la interacción celular y además son capaces de clivar tanto moduladores solubles como presentes en la superficie de las células, regulando de esta manera la conducta de las mismas (Somerville y col., 2003).

La cercanía evolutiva que relaciona a las proteasas componentes de la familia de las MMPs puede verse reflejada en la conservación de los dominios que componen su

estructura, y sus mecanismos catalíticos y de regulación. La familia de las MMPs está dividida en 5 subgrupos basados en sus sustratos de preferencia o similitudes estructurales. Colagenasas: degradan principalmente el colágeno fibrilar; gelatinasas: degradan el colágeno desnaturalizado; estromelisininas: degradan los componentes no relacionados con el colágeno presentes en la MEC; metaloproteasas de membrana (MT-MMPs): permanecen ancladas a la membrana celular; y las metaloelastasas: grupo de MMPs menos caracterizadas.

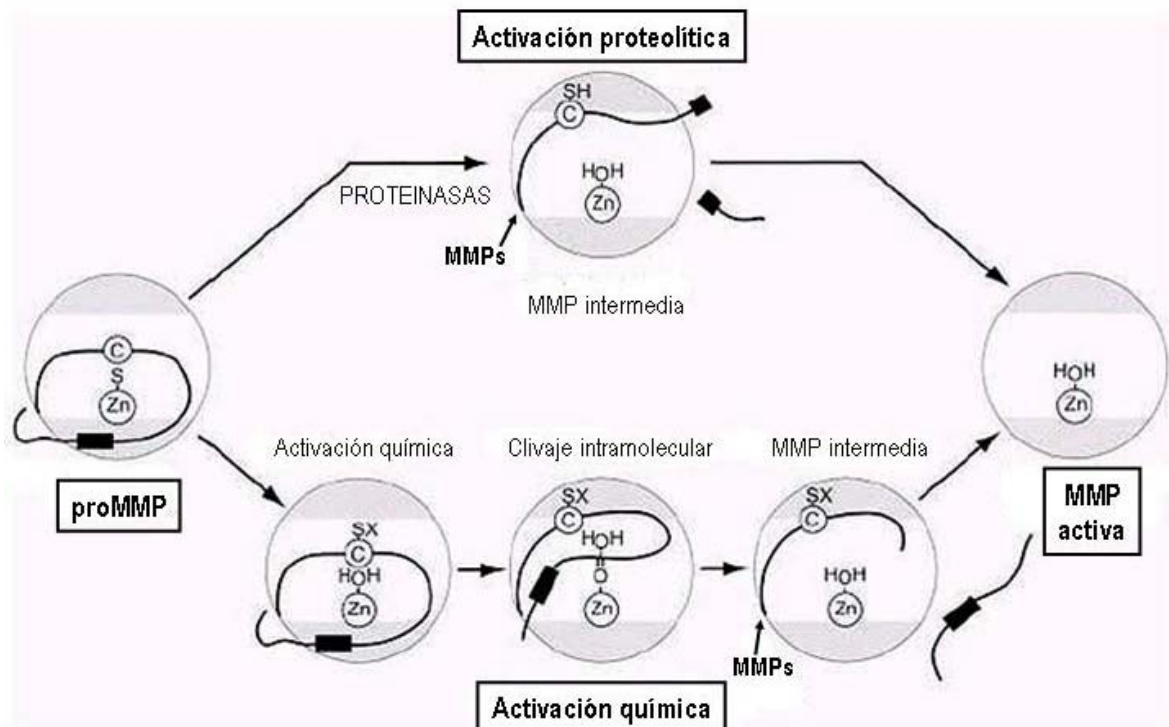
Todas las MMPs excepto MMP-7 y MMP-26 están compuestas por dos dominios conectados por un péptido rico en prolina. Los dominios comprenden un dominio catalítico y un dominio auxiliar que contiene secuencias parecidas a la hemopepsina y la vitronectina. El dominio catalítico está constituido por un péptido señal, el prodominio y el núcleo catalítico. MMP-2 y MMP-9 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; Shipley y col., 1996). MMP-9 presenta un injerto adicional en el péptido medio que es similar al colágeno tipo V, pero su función aún se desconoce (Figura VIII).



**Figura VIII:** Características estructurales de las metaloproteinasas (Somerville y col., 2003).

Debido a su potencial de destrucción tisular, las MMPs están estrictamente reguladas a múltiples niveles, incluyendo la transcripción, activación del zimógeno, inhibidores extracelulares, localización dentro o fuera de la célula e internalización por endocitosis. El prodominio mantiene la enzima inactiva por medio de la unión del grupo tiol de 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 óxido nítrico o las especies reactivas del oxígeno (Gu y col., 2002; Pustovrh y col., 2000 y 2002; Jian y Rosenberg, 2005). Cuando esto sucede el grupo tiol es reemplazado por el agua y la enzima adquiere la capacidad de hidrolizar el propéptido para su completa activación. Este sistema de regulación lleva el nombre de “switch de cisteína” (Figura IX).



**Figura IX:** Caminos de activación de las prometaloproteinasas.

Las metaloproteinasas secretadas como zimógenos inactivos pueden ser activadas por acción de otras proteínas (camino superior) o por agentes no proteolíticos (camino inferior). El dominio catalítico es representado como un círculo gris que contiene el sitio activo, el que está a su vez representado como una zona blanca, que contiene el átomo de zinc. El propéptido que mantiene inactiva la proenzima por medio de la unión de la cisteína (C) al átomo de zinc es representado en negro. SH indica el sulfhidrilo de la cisteína. La activación por proteasas es mediante el clivaje

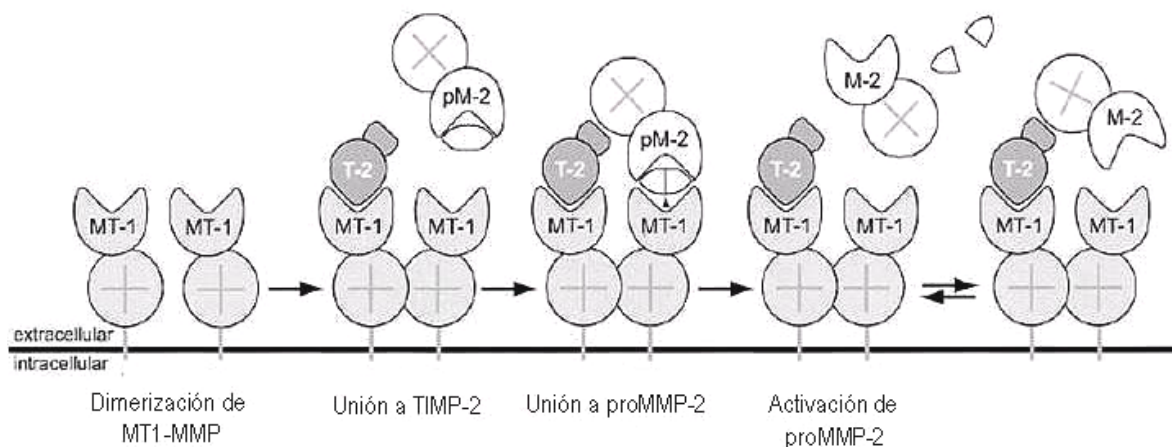
del propéptido, esto lleva a la activación parcial de la MMP. La completa activación de la MMP se alcanza cuando todo el propéptido es removido por medio de mecanismos intermoleculares. La activación química produce una modificación del sulfidrilo del switch de cisteína (SX) resultando en la activación parcial de la MMP que adquiere la capacidad de clivar el propéptido (Visse y Nagase, 2003).

Una vez activa, existen múltiples mecanismos que pueden regular la actividad de las MMPs. 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 metaloproteinasas (TIMPs), proteínas de 20 a 30 kDa que interactúan de manera directa con las MMPs uniéndose al sitio activo por medio de un pequeño número de aminoácidos. Actualmente están descritos cuatro TIMPs: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4, los mismos poseen la capacidad de inhibir todas las MMPs, siendo TIMP-1 preferente inhibidor de MMP-9 y TIMP-2 de MMP-2 (Woessner, 1999; Folgueras y col., 2004). Se encuentran ampliamente expresados en todos los tejidos y mayoritariamente son regulados de manera conjunta con las MMPs. Además de la inhibición de las MMPs, los TIMPs participan en funciones de diferenciación celular. Por ejemplo, se ha demostrado que TIMP-1 posee actividad proliferativa en las células endoteliales (Tyagi y col., 1996), TIMP-2 estimula el crecimiento de los fibroblastos (Nemeth y Goolsby, 1993) y TIMP-3 es un factor inductor de apoptosis de las células vasculares del músculo liso (Baker y col., 1998).

Las otras clases de inhibidores involucran a un pequeño péptido derivado de la proteólisis de la procolágeno-C-proteinasa, que 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 a una proteína de membrana que puede regular la actividad de las MMP-2, MMP-9 y MMP-14 por interactuar con su sitio activo (Oh y col., 2001). Por último, se encuentra la  $\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 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).

Paradójicamente, MMP-2 necesita de la presencia de TIMP-2 para ser activada por MT1-MMP (MMP-14). ProMMP-2 forma un complejo con TIMP-2 a través de su dominio carboxilo terminal permitiendo que el extremo amino del TIMP-2 se una al sitio catalítico de una MT1-MMP en la superficie de la célula, luego otra MT1-MMP presente en la superficie celular puede unir el extremo amino terminal de proMMP-2 catalizando su activación por acción del clivaje del prodominio (Visse y Nagase, 2003) (Figura X).



**Figura X:** Activación de proMMP-2 por medio del complejo MT1-MMP y TIMP-2. Una molécula activa de MT1-MMP en membrana (MT-1) se une a una molécula de TIMP-2 (T-2) que inhibe su actividad. MT1-MMP puede formar dímeros o multímeros en la membrana celular por medio de la interacción de su dominio hemopexina. Posteriormente una molécula de proMMP-2 (pM-2) se une al dominio C-terminal de TIMP-2 por su dominio hemopexina y una segunda molécula de MT1-MMP activa produce el clivaje del prodominio de proMMP-2 tornándola activa, luego MMP-2 (M-2) se disocia de la MT1-MMP y adquiere su completa activación por procesos intermoleculares (Visse y Nagase, 2003).

### **Participación de las MMPs en los procesos reproductivos fisiológicos y patológicos**

Las metaloproteasas 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).



Los roedores han sido utilizados ampliamente para el estudio del proceso de implantación. En estos modelos 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 MMP-2 y MMP-9 por parte del blastocisto y la decidua materna (Alexander y col., 1996; Novaro y col., 2002). En humanos se observó que los trofoblastos secretan alta cantidad de gelatinasas durante el primer trimestre de gestación, acompañando el establecimiento y diferenciación del órgano placentario (Polette y col., 1994). En esta etapa cobra importancia la secreción de MMP-9 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).

El reacomodamiento del tejido uterino que permite el crecimiento fetal está vinculado con la reestructuración de la matriz extracelular decidual y de las membranas embrionarias. Al término de la gestación estas membranas sufren la ruptura durante la labor de parto, esta ruptura que se produce de manera mecánica es causada por las contracciones del miometrio. La ruptura de membranas es a su vez regulada por un incremento en la actividad enzimática de MMP-9 que degrada el colágeno de la MEC (Vadillo-Ortega y col., 1995; Goldman y col., 2003). Si este incremento en la actividad de MMP-9 se produce temprano en la gestación, ocurre una ruptura prematura de la membrana corioamniótica (Vadillo-Ortega y Estrada-Gutiérrez, 2005).

Los eventos de desarrollo embrionario están caracterizados por procesos de migración celular, cambios en la morfología tisular y extensa reestructuración de la MEC. Estos cambios en el desarrollo embrionario temprano no se correlacionan con altos niveles de MMPs. De hecho, estas enzimas se expresan débilmente en los tejidos embrionarios

(Hulboy y col., 1997). 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 ramificación de los ductos de la glándula salival, los pulmones y las glándulas mamarias (Nakanishi y col., 1986; Ganser y col., 1991; Sympson y col., 1994; Witty y col., 1995; Simian y col., 2001), así como la diferenciación de las estructuras que componen los arcos mandibulares (Chin y Werb, 1997).

### **MMPs en la patología diabética**

En la diabetes un gran número de complicaciones están relacionadas con un desbalance en la actividad de las MMPs y con alteraciones en el metabolismo del colágeno. Estudios en modelos desarrollados en roedores, mostraron que las lesiones glomerulares presentes en la nefropatía diabética están asociadas con un incremento en la deposición de laminina y colágeno tipo IV, en conjunto con una disminución en la expresión de MMP-2 (Inada y col., 2005). La retinopatía diabética se asocia con una elevada degradación de la MEC y un incremento en los niveles de MMP-2, MMP-9 y MMP-14 (Jin y col., 2001; Giebel y col., 2005). Estudios realizados en humanos mostraron 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). En cuanto al desarrollo de vasculopatías en pacientes diabéticos tipo 2, éste puede ser relacionado con un aumento de MMP-8 y MMP-9 plasmáticas (Kato y col., 2005; Signorelli y col., 2005).

Forsberg y col., han demostrado que en la placenta diabética de rata a término existen alteraciones en los componentes fibrilares de la MEC, reportando una disminución en la deposición de laminina y un incremento en los niveles de fibronectina (Forsberg y col., 1998). Nuestros estudios previos muestran que durante el período peri-implantatorio la MMP-2 se incrementa en tejido uterino diabético comparado con el de ratas sanas (Pustovrh y col., 2002). Asimismo, hemos determinado la actividad de metaloproteinasas en tejido placentario de mujeres diabéticas pregestacionales y

gestacionales a término, encontrando que este parámetro está alterado en relación con dicha actividad en placentas de mujeres sanas (Pustovrh y col., 2000).

La diabetes materna afecta la composición de la MEC y los niveles de las MMPs, enzimas encargadas de su degradación. Estas alteraciones en la interfase feto materna pueden afectar el normal desarrollo de la placenta alterando el intercambio de gases y nutrientes desde la madre hacia el feto.

*Sabiendo que en la patología diabética existen importantes complicaciones en la gestación y que se han evidenciado alteraciones asociadas a la actividad de las MMPs en los tejidos reproductivos, consideramos de interés el estudio de la actividad gelatinásica en los procesos de desarrollo placentario y fetal, y sus anomalías producto de la diabetes materna, alteraciones probablemente asociadas a los procesos dismorfogénicos fetales y placentarios inducidos por esta patología.*

## ∞ ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) pueden ser generadas en las células por una variedad de mecanismos, en los cuales se incluye la fosforilación oxidativa en la mitocondria, donde los ROS son un subproducto del metabolismo aerobio celular fisiológico (Davis, 1995).

Cada átomo de oxígeno contiene dos electrones desapareados en su última capa. Los átomos y moléculas con electrones desapareados son designados *radicales libres*, y son entidades sumamente reactivas que pueden participar en un amplio rango de reacciones químicas y bioquímicas. El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es caracterizado como un di-radical, el cual requiere de 4 electrones para su completa reducción a  $H_2O$  como evento terminal de la cadena de transporte de electrones. La secuencial donación de electrones al oxígeno puede generar radicales libres como productos intermediarios. De tal forma, la donación de un único electrón a la molécula de  $O_2$  resulta en la generación del radical

superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), la donación de un segundo electrón da origen al peróxido, que por posterior protonación origina el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). La donación de un tercer electrón como ocurre en la reacción de Fenton:



resulta en la producción de un compuesto altamente reactivo como es el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). Finalmente la donación de un cuarto electrón resultará en la formación de agua (Giordano, 2005).

En forma adicional, las especies reactivas del oxígeno pueden ser producidas en los tejidos por acción de las enzimas xantina oxidasa, NADPH oxidasa, y citocromo P450, la autooxidación de catecolaminas, o el desacoplamiento de la enzima NOS (Xia y col, 1998; Griendling y col, 2000; Giordano, 2005). El NO posee un electrón desapareado y bajo determinadas condiciones puede reaccionar con  $O_2^{\cdot-}$  generando el radical peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ ), un poderoso agente oxidante.

Existen diversos mecanismos que contrarrestan la generación de ROS, éstos incluyen vías enzimáticas y no enzimáticas. Las vías enzimáticas mejor caracterizadas son la catalasa y la glutatión peroxidasa, que coordinan el pasaje de  $H_2O_2$  a  $H_2O$ , y la superóxido dismutasa (manganeso superóxido dismutasa, Mn-SOD) en la mitocondria y cobre superóxido dismutasa (Cu-SOD) presente en el citosol, que facilitan la formación de  $H_2O_2$  a partir de  $O_2^{\cdot-}$ . Adicionalmente se conoce el efecto de la tiorredoxina y tiorredoxina reductasa, que en conjunto forman un sistema enzimático antioxidante adicional, el cual es capaz de catalizar la regeneración de una amplia variedad de moléculas antioxidantes como la ubiquinona (Q10), el ácido lipoico y el ácido ascórbico. Los mecanismos no enzimáticos incluyen a los antioxidantes intracelulares como la vitamina E, C y  $\beta$ -caroteno, ubiquinona, ácido lipoico y el urato (Nordberg y Arner, 2001).

### **Función biológica de las especies reactivas del oxígeno**

Las especies reactivas del oxígeno tienen un importante rol en diversos procesos biológicos, se encuentran implicadas en caminos de señalización celular actuando en algunas circunstancias como segundos mensajeros río abajo de ligandos como TGF- $\beta$ 1, FGF-2 y endotelinas, entre otros (Turpaev, 2002). Los ROS también participan en la actividad moduladora de factores de transcripción específicos como NF-kB, que se torna transcripcionalmente más activo en respuesta a estas especies, dado que éstas contribuyen a la degradación de I-kB (Hsu y col., 2000). Pero quizás la más ampliamente conocida de las características de las especies reactivas del oxígeno es su interacción directa con los lípidos, las proteínas y el ADN de las células, causando daño y muerte celular. Esto ocurre cuando las defensas antioxidantes del organismo son sobrepasadas por una alta oferta de dichas especies oxidantes. La peroxidación lipídica es un efecto bien caracterizado de los ROS que resulta en el daño de las membranas celulares como así también de las membranas de las organelas, alterando su estructura y la fluidez de las mismas (Rathore y col., 1998). Asimismo puede causar profundas alteraciones en las vías de señalización intracelular que dependen de dichos lípidos. Las especies reactivas del oxígeno pueden inducir daños a nivel del ADN por ruptura de sus hebras, oxidación de la purina o entrecruzamiento entre proteínas nucleares y ADN (Hensley y col., 2000; Suematsu y col., 2003). A nivel de las proteínas la acción de los ROS incrementa la presencia de grupos carbonilos y puede causar inactivación o inducir la desnaturalización de las mismas provocándole la pérdida de funcionalidad (Lockwood, 2000; Stadtman y Levine, 2003).

### **Estrés oxidativo en la patología diabética**

El estrés oxidativo es definido como un exceso en la producción o insuficiencia en la remoción de moléculas altamente oxidantes como las especies reactivas del oxígeno (Myatt y Cui, 2004).

Hay múltiples fuentes de estrés oxidativo en la diabetes que involucran caminos no

enzimáticos, enzimáticos y mitocondriales. Las fuentes no enzimáticas de estrés oxidativo son originadas principalmente a través de la oxidación bioquímica de la glucosa, de esta manera la hiperglucemia puede causar directamente un incremento de la generación de los ROS debido a su autooxidación, que genera radicales hidroxilos ( $\cdot\text{OH}$ ) (West, 2000). Además, la glucosa es capaz de reaccionar con las proteínas de manera no enzimática originando productos de glicosilación avanzada (AGEs), que provocan la pérdida de la función biológica de estas moléculas y generan radicales libres de oxígeno. La hiperglucemia origina asimismo un incremento en el metabolismo de la glucosa a través de vías no tradicionales como el camino de los polioles y el de las hexosaminas, así como la sobreactivación de PKC y la generación de diacilglicerol, rutas metabólicas que habitualmente resultan en un aumento en la generación de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Las fuentes enzimáticas de producción de especies reactivas en la diabetes, involucran a las enzimas COX, NOS, NADPH oxidasa y xantina oxidasa. Todas las isoformas de la NOS requieren para su correcto funcionamiento de 5 cofactores o grupos prostéticos: flavina adenosina dinucleótido (FAD), flavina mononucleótido (FMN), el grupo hemo,  $\text{BH}_4$  y  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina. La falta de L-arginina (sustrato de la NOS), o la deficiencia de alguno de sus cofactores produce el desacoplamiento de la enzima, la cual comienza a generar  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en lugar de NO (Tiefenbacher y Kreuzer, 2003). La NADPH oxidasa, una enzima asociada a la membrana, parece ser la mayor productora de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en la diabetes, dado que en esta patología se produce un incremento de NADH, que es el sustrato de la enzima (Johansen y col., 2005). La cadena respiratoria mitocondrial es otra fuente de generación de especies reactivas del oxígeno que se ve alterada en condiciones de hiperglucemia. Normalmente el  $\text{O}_2^{\cdot-}$  generado en la cadena es rápidamente eliminado por acción de las enzimas antioxidantes, pero en el organismo diabético se genera un ciclo vicioso que eleva la producción mitocondrial de ROS y sobrepasa la capacidad detoxificante (Nishikawa y col., 2000).

Actualmente, existen muchos trabajos tanto clínicos como experimentales que muestran un fuerte vínculo entre los ROS y las complicaciones en la gestación diabética.

La gestación por sí misma, trae aparejado un incremento en la concentración de lipoperóxidos placentarios, pero este aumento va acompañado por un incremento en los niveles de sus enzimas depuradoras, como por ejemplo la SOD (Walsh, 1998; Myatt y Cui, 2004, White y col., 2002). En las mujeres gestantes diabéticas este incremento en los niveles de lipoperóxidos es mucho mayor y no se encuentra acompañado por un aumento en la capacidad antioxidante (Pustovrh y col., 2000; Myatt y Cui, 2004). Este aumento generalizado del estrés oxidativo materno afecta la placenta provocando tanto disfunción a nivel vascular (Myatt y col, 2000), como a nivel metabólico (Desoye y col., 2002; White y col., 2002). Se ha observado en roedores, que este desbalance en los niveles de ROS maternos se ve reflejado en el desarrollo embrionario provocando alteraciones en las bases del ADN (Viana y col., 2000) e inhibición de la expresión de genes requeridos para el desarrollo embrionario como por ejemplo Pax-3, involucrado en el cierre del tubo neural (Chang y col., 2003). La administración de antioxidantes disminuye la tasa de malformaciones embrionarias y las alteraciones metabólicas placentarias que se observa en los modelos experimentales de diabetes (Viana y col., 1996; Siman y Eriksson, 1997; White y col., 2002), estableciendo un nexo claro entre el estrés oxidativo y los procesos teratogénicos inducidos por la diabetes materna.

## ∞ EL OXIDO NITRICO

El NO es un pequeño mensajero gaseoso producido por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de arginina, tiene una vida media corta y es rápidamente metabolizado por oxidación no enzimática a nitratos y nitritos.

Existen tres isoformas de la NOS derivadas de diferentes genes pero con similar estructura y función. Estas son: NOS neuronal (nNOS/ tipo I), NOS inducible (iNOS/ tipo II) y NOS endotelial (eNOS/ tipo III). Las isoformas nNOS y eNOS son

constitutivas, y su actividad es modulada por  $\text{Ca}^{++}$ -Calmodulina. La iNOS es inducible por compuestos cuya producción se incrementa en cuadros patológicos como el estrés, los procesos inflamatorios e infecciosos y la hipoxia (Moncada y col., 1991). La mayor diferencia entre las NOS constitutivas y la isoforma inducible no es la concentración de NO generada por enzima, sino el tiempo en que dichas enzimas se hallan activas: mientras que las isoformas constitutivas generan NO en pulsos controlados, la iNOS lo hace de manera sostenida en el tiempo (Laurent y col., 1996).

### **Función biológica del óxido nítrico**

El óxido nítrico regula el tono vascular, la agregación plaquetaria, la adhesión leucocitaria, la transmisión sináptica y ciertas conductas del sistema inmune, donde tiene la capacidad de actuar de manera paradójica, tanto como agente citoprotector como citotóxico (Ignarro, 1990; Moncada y col., 1991; Jones y Bolli, 2005). La diversidad de las funciones biológicas del NO tiene su origen en su naturaleza reactiva y sus diversos mecanismos de acción. El NO puede actuar produciendo una inhibición de la cadena respiratoria o de la síntesis de ADN, activando la guanidil ciclasa para producir cGMP, estimulando la ciclooxigenasa para producir prostaglandinas o bien por nitrosilación de proteínas que modifica, entre otros aspectos, la función enzimática (Kröncke y col., 1997). El NO está involucrado en la función reproductiva influenciando la sincronidad de los ciclos estrales, el comportamiento en el apareo y la regulación de la función ovárica (Knauf y col., 2001; Rettori y col., 1993). Es asimismo un factor determinante en la decidualización y en el proceso de implantación. (Novaro y col., 1997 y 2001). Durante la preñez su presencia asegura la quiescencia uterina y provoca la vasodilatación necesaria para el establecimiento del flujo sanguíneo que nutrirá al embrión. Su incremento parece estar involucrado en la re-absorción embrionaria y la pérdida del embarazo (Ogando y col., 2003). Por otra parte, así como es un factor que, a través del aumento de cGMP, mantiene al músculo liso relajado durante la gestación, la



producción de NO placentario a término, a través de la activación de COX y consiguiente incremento en la producción de prostanoïdes, estaría involucrada en el desencadenamiento del trabajo de parto (Buhimschi y col., 1996, Jawerbaum y col., 1996; González y col., 1998).

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

correcta formación y crecimiento de las extremidades en el desarrollo embrionario de la rata (Pierce y col., 1995).

### **El óxido nítrico en la patología diabética**

El incremento de NO es un factor de importancia en la destrucción de los islotes  $\beta$  pancreáticos que dan origen a la diabetes (González y col., 2001 a y b).

El aumento de citoquinas producido durante el ataque autoinmune en la diabetes mellitus induce a su vez un incremento en la expresión y en la actividad de iNOS, que produce NO en cantidades superiores a las originadas por las isoformas constitutivas. Este compuesto es un importante mediador del daño a los islotes pancreáticos (Corbett y col., 1992). En efecto, la expresión de la iNOS está incrementada durante el desarrollo de la enfermedad en modelos experimentales de diabetes (Kleeman y col., 1993). Además de su rol en la destrucción del páncreas en la diabetes insulino dependiente, el metabolismo del NO se ve afectado por la hiperglucemia, y el estrés oxidativo que caracterizan a la enfermedad (González y col., 1999, 2000, 2001a, 2001b)

Como ya fue explicado anteriormente, la hiperglucemia origina un aumento de las especies reactivas del oxígeno. La generación de aniones superóxido, que reaccionan con NO produciendo peroxinitritos, es causante del daño endotelial por nitrosilación (Bonfont-Rousselot, 2002). Por otra parte el estrés oxidativo provoca la oxidación e inactivación de tetrahidrobiopterina, cofactor de la NOS. En ausencia de su cofactor, la enzima se desacopla, aumentando de esta manera la producción de peroxinitritos a expensas de NO (Tiefenbacher y Kreuzer, 2003). La falta de biodisponibilidad del óxido nítrico provoca una disminución en los efectos de relajación y antiagregación plaquetaria que contribuyen al daño endotelial. Este mecanismo también produce alteraciones en la placenta y el útero, y modifica el flujo sanguíneo útero-placentario (Myatt y Cui, 2004). En estudios realizados tanto por otros autores como en nuestro grupo de trabajo, se ha observado un aumento de residuos de nitrotirosina (índice del daño provocado por peroxinitritos) en placenta proveniente de pacientes diabéticas y de ratas diabéticas

(Lyall y col., 1998; Capobianco y col., 2005). Asimismo se ha demostrado que el endotelio placentario de pacientes diabéticas no responde a vasodilatadores y vasoconstrictores como lo hace el proveniente de mujeres sanas, y que el endotelio sano pre-tratado con peroxinitritos muestra una posterior disminución en la respuesta a los agentes vasoactivos (Kossenjans y col., 2000). Estos descubrimientos asignan al metabolismo nitridérgico, y al estrés nitrosativo un rol central en la regulación del flujo sanguíneo placentario.

En nuestro laboratorio se ha observado que los niveles de NO se encuentran elevados en embriones de ratas diabéticas en la etapa de organogénesis temprana. La producción embrionaria de prostaglandina E<sub>2</sub>, metabolito del ácido araquidónico, está modulada positivamente por el NO; sin embargo esta regulación no es funcional en embriones provenientes de ratas con diabetes severa (Jawerbaum y col.,2001). Asimismo, el NO regula positivamente la síntesis embrionaria de Endotelina-1, un péptido vasoactivo e importante morfógeno, cuya producción y mecanismos regulatorios se hallan asimismo alterados en los embriones que provienen de ratas diabéticas (Sinner y col., 2002). Por otra parte, el NO es un importante regulador de la refinación tisular en los tejidos embrionarios durante la organogénesis, a través de la inducción de apoptosis de las estructuras transitorias que se evidencian durante dicho desarrollo (Jawerbaum y González, 2005a). Por lo antedicho, la sobreproducción embrionaria de NO y la alteración de los mecanismos regulados por dicho compuesto se verá reflejado en la aparición de dismorfogénesis y en un incremento en el índice de malformaciones congénitas en la descendencia de gestantes diabéticas.

## ∞ PPARs < RECEPTORES ACTIVADOS POR FACTORES DE PROLIFERACION PEROXISOMAL >

Los receptores activados por factores de proliferación peroxisomal (PPARs) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de hormonas (NHR) (Michalik y col., 2002). Existen tres subtipos, PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  y PPAR $\gamma$ . Los mismos están organizados en 4 dominios, el dominio de unión al ADN unido por la región media al dominio carboxilo terminal, el dominio de unión al receptor del ácido retinoico (RXR) y el dominio amino terminal que está involucrado en la activación del receptor no dependiente de ligandos. La unión de los PPARs con sus ligandos induce cambios conformacionales que llevan a la liberación del co-represor y al reclutamiento del co-activador. Subsecuentemente, el receptor activado puede activar o inhibir la expresión de genes que contienen en su promotor los elementos de respuesta a PPARs. Los PPARs pueden ser activados por diversos ligandos que incluyen a ácidos grasos de cadena larga, eicosanoides, leucotrienos, hipolipemiantes sintéticos (fibratos) y agentes antidiabetogénicos (tiazolidinedionas) (Krey y col., 1997). En particular la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) es un ligando endógeno de PPAR $\gamma$  que promueve la diferenciación de los adipocitos (Kiewer y col., 1995). Muchos de los genes blanco de los PPARs están involucrados en el metabolismo lipídico y la homeostasis energética (Schoonjans y col., 1996).

### **Función biológica de los PPARs**

Las funciones de los PPARs mejor caracterizadas son las que vinculan al PPAR $\alpha$  con el catabolismo de los ácidos grasos en el hígado, y la función opuesta pero complementaria de PPAR $\gamma$  en la adipogénesis y almacenamiento de lípidos (Pineda Torra y col., 1999; Barak y col., 1999; Kliewer y col., 2001).

Además, los PPARs se encuentran involucrados en el desarrollo de la placenta y el embrión. Los estudios realizados en roedores establecieron que PPAR $\alpha$  y  $\gamma$  aparecen tardíamente en el desarrollo embrionario siguiendo un patrón similar a aquél que caracteriza la posterior distribución encontrada en el animal adulto. PPAR $\alpha$  está presente en el hígado, riñón, intestino, corazón, músculo esquelético, glándula adrenal y páncreas, mientras que durante el desarrollo embrionario la expresión de PPAR $\gamma$  se encuentra restringida al tejido adiposo y al sistema nervioso central. En cambio PPAR $\beta$  es expresado de manera ubicua y aparece muy tempranamente en el desarrollo embrionario. El mismo se encuentra presente ya en el día 8.5 de gestación, en el ectodermo y endodermo visceral y parietal (Michalik y col., 2002).

Existen pocos datos acerca de la expresión de PPARs en los embriones humanos. Huin y col., han descrito la presencia de las tres isoformas de PPARs en células de origen mesodérmico y endodérmico en la semana 7 de gestación, las cuales se expresan en el tracto digestivo fetal desde las semanas 7 a la 23 de gestación, y posteriormente en el ileon (Huin y col., 2000). Estas tres isoformas también han sido detectadas por medio de estudios inmunohistoquímicos en la capa del trofoblasto sincicial de las vellosidades placentarias humanas a término (Wang y col, 2002).

Los estudios realizados en animales dobles mutantes recesivos para el gen de PPAR $\gamma$  presentan el inconveniente de la alta tasa de mortalidad embrionaria en el día 10.5, coincidiendo con el comienzo de la funcionalidad de la placenta en cuanto a transporte de oxígeno y nutrientes. Esto ocurre porque el receptor está implicado en el establecimiento y desarrollo de la vasculatura fetal en la zona del laberinto. Se ha reportado el nacimiento de un único animal mutante recesivo, y el mismo mostró fallas en la formación del corazón y ausencia de tejido adiposo (Barak y col., 1999).

### **PPARs en la patología diabética**

Los PPARs regulan una serie de procesos metabólicos relacionados con los lípidos y los hidratos de carbono, por lo cual su expresión y/o activación se muestra alterada en

patologías como dislipidemia, obesidad, resistencia a la insulina y diabetes. Sin embargo existen muy escasos datos acerca del rol de los PPARs en el desarrollo placentario y fetal en la gestación diabética. Estudios previos de nuestro grupo mostraron que la expresión de PPAR $\gamma$  disminuye en la placenta a término tanto de pacientes como de ratas diabéticas, tejidos en los que este receptor se encuentra involucrado en la regulación del metabolismo lipídico y la producción de NO (Jawerbaum y col., 2004; Capobianco y col., 2005). Por otro lado, una expresión alterada de los PPARs durante el desarrollo del corazón se encuentra implicada en el establecimiento de anomalías cardíacas fetales que se asemejan a la que presentan los fetos de madres diabéticas (Finck y col., 2002).

## ∞HIPÓTESIS∞

*Los niveles y actividad de las MMP-2 y MMP-9 se encuentran alterados en la unidad feto-placentaria de rata diabética. Dichas alteraciones son inducidas por un elevado índice de estrés oxidativo y nitrosativo, y por alteraciones en la expresión y activación de los receptores nucleares PPAR $\gamma$ .*

## ∞OBJETIVOS∞

### **Objetivo general:**

Investigar las alteraciones producidas por la diabetes materna en la rata, sobre la expresión y actividad de las metaloproteinasas placentarias y fetales, estableciendo la función moduladora del estrés oxidativo y nitrosativo, y los posibles mecanismos reguladores de 15d-PGJ<sub>2</sub>, ligando endógeno de los receptores nucleares PPAR $\gamma$ , sobre la función metaloproteásica en la unidad feto-placentaria, como así también las posibles alteraciones en la producción de estos agentes regulatorios inducidas por la patología diabética.

### **Objetivos particulares:**

Evaluar en la unidad feto-placentaria de ratas sanas y diabéticas a mediados de la gestación:

- Los niveles de MMPs y su actividad enzimática.
- Los niveles de TBARs y la actividad de las enzimas Catalasa y SOD.
- Los niveles de nitratos/nitritos, NADPH-d y residuos de nitrotirosina.
- Los niveles de PPAR $\gamma$  y de su ligando endógeno, 15d-PGJ<sub>2</sub>.
- La capacidad moduladora de ROS y NO sobre la actividad de las MMPs.
- La capacidad moduladora de 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la actividad de las MMPs.
- La expresión de los TIMPs y su modulación por 15d-PGJ<sub>2</sub>.



## ∞ MATERIALES Y MÉTODOS ∞

### **Materiales:**

**Anticuerpos:** se utilizaron anticuerpos monoclonales anti MMP-2, MMP-9 y residuos de nitrotirosina, desarrollados en ratón (CALBIOCHEM); anti- PPAR $\gamma$  desarrollado en conejo (SANTA CRUZ) y anti  $\beta$ -actina desarrollado en conejo (SIGMA). Los anticuerpos secundarios fueron anti-IgG de ratón desarrollado en cabra, anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa (SIGMA) y anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (SANTA CRUZ).

**Drogas y reactivos:** Se utilizaron 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 y azul de bromofenol (BIORAD); estreptozotocina, buffer citrato, rojo Ponceau S y tetrametilenetilendiamina (TEMED); ácido tiobarbitúrico (TBA), malonildialdehído (1,1,3,3) tetraetoxipropano (MDA), sustrato fosfatasa alcalina (BCIP/NBT), 3,3' diamino-benzidina (DAB), seroalbumina bovina (BSA), ácido etilendiamintetraacético (EDTA), superóxido dismutasa, nitroprusiato de sodio, N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-ester (NAME), adrenalina,  $\beta$ -NADPH, azul de nitro-tetrazolio y ECL-sistema de detección (SIGMA). Se utilizaron asimismo, ácido tricloro acético (TCA) (J. T. BAKER), peróxido de hidrógeno (MALLINCKRODT), persulfato de amonio (PROMEGA) y 15 deoxy delta <sup>12,14</sup> Prostaglandina J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) (CAYMAN CHEMICAL).

**Equipos de determinación colorimétrica:** el ensayo de Nitratos/Nitritos correspondió a un equipo comercial de ASSAY DESIGN; 15d-PGJ<sub>2</sub> fue evaluada mediante un equipo comercial de CAYMAN CHEMICAL.

**Solventes y sales:** Se utilizaron ácido acético (ANEDRA), glicerol (BIOPACK), etanol absoluto y metanol (CICARELLI), formaldehído, NaCl, KCl y CaCl<sub>2</sub> (MALLINCKRODT), xilol (SINTORGAN), glucosa y NaHCO<sub>3</sub> (ANEDRA).

**Programas de análisis de imagen:** fueron utilizados los programas Zeiss Kontron VIDAS (ZEISS) y Sigma Gel (SIGMA).

**Otros:** membrana de nitrocelulosa, cóctel inhibidor de proteasas, gelatina de piel de porcino tipo A, y complejo soluble peroxidasa anti-peroxidasa (PAP) desarrollado en ratón y suero de cabra (SIGMA), películas autoradiográficas (KODAK), marcadores de peso molecular preteñidos (FERMENTAS), medio de montaje DPX (FLUKA), medio de montaje para crióstato (TISSUE TEK), Lector Accu Check para determinación de glucemias y tiras de determinación de glucemia (ROCHE), parafina (PARAPLAST), hematoxilina (MALLINCKRODT), Triton X-100 (ROHM & HAAS) y Tween-20 (MERCK). Medio condicionado HT-1080 (fibrosarcoma humano) del Laboratorio de Investigación del Cáncer, CEFYBO, Argentina.

**Animales:** Ratas hembra de la cepa Wistar fueron adquiridas al 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 y agua *ad libitum*, bajo un ciclo de 12 hs de luz y 12 hs de oscuridad, a 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

### A. Modelo experimental

#### **Modelo experimental de diabetes**

*Neonatos de 2 días de edad fueron inyectados en forma subcutánea con 90 mg/kg de estreptozotocina disuelta en buffer citrato, según la técnica descrita por Portha y col., 1979. El estado diabético fue confirmado en los animales adultos mediante curvas de tolerancia a la glucosa (Maloff y Boyd, 1986). Sólo se utilizaron aquellos animales cuyos valores de glucemia fueron superiores a 150 mg/dl, 120 min. después de la administración de 1.5 g/kg de glucosa intraperitoneal. En los animales control este valor fue de 100 mg /dl.*

#### Apareos

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

### B. Determinaciones

#### **Preparación de los tejidos**

En el día 13.5 de preñez, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. El útero completo fue removido y colocado en una placa de Petri con solución buffer Krebs Ringer Bicarbonato (KBS) (Glucosa 11 mM, Na<sup>+</sup> 145 mM, Ca<sup>2+</sup> 2.2 mM, Cl<sup>-</sup> 127 mM, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 25mM; Mg<sup>2+</sup> 1.2 mM, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 1.2 mM y PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 1.2 mM). Luego de determinarse

macroscópicamente el número de implantaciones y reabsorciones, se aisló la placenta del feto y bajo lupa se procedió a separar las placas placentarias materna y fetal. En esta etapa del desarrollo placentario, no existe infiltración de la decidua materna por parte de los trofoblastos, y las estructuras placentarias son fácilmente distinguibles (Teessalu y col., 1999).

Los tejidos fueron fijados para las técnicas de inmunohistoquímica, incubados o conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la determinación proteica y análisis bioquímicos, según la evaluación a la cual serían sometidos posteriormente.

### **Determinaciones en suero materno y en líquido amniótico**

Para evaluar los niveles de glucemia en la sangre materna y en el líquido amniótico se utilizaron tiras reactivas comerciales. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena central ubicada en la cola de los animales y las muestras de líquido amniótico fueron obtenidas inmediatamente después del sacrificio de los animales.

### **Incubaciones tisulares**

Los tejidos se incubaron durante una hora en baño metabólico bajo atmósfera controlada ( $\text{CO}_2$ : 5%;  $\text{O}_2$ : 95%) a  $37^{\circ}\text{C}$ , en 500  $\mu\text{l}$  de medio KBS con o sin el agregado de diversos agentes, según se detalla a continuación:

- I. Estudio de la regulación de la actividad de MMPs por las especies reactivas del oxígeno:
  - a) Sin adición.
  - b) Con adición de un agente oxidante: peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 50  $\mu\text{M}$ .
  - c) Con adición de una enzima capturadora de especies reactivas del oxígeno: superóxido dismutasa (SOD).

- II. Estudio de la regulación de la actividad de MMPs por óxido nítrico:
- a) Sin adición.
  - b) Con adición de un inhibidor de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS): N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME) 600 μM.
  - c) Con adición de un dador de NO al medio de incubación: nitroprusiato de sodio (NP) 600 μM.
- III. Estudio de la regulación de la actividad de MMPs por 15d-PGJ<sub>2</sub>:
- a) Sin adición.
  - b) Con adición de 15dPGJ<sub>2</sub> [2 x 10<sup>-6</sup> M].

Luego de los tratamientos, alícuotas del medio de incubación se congelaron a -20 °C, para posteriores determinaciones del contenido de proteínas y para la determinación de actividad de MMP-2 y MMP-9.

### **Inmunolocalización de MMPs y residuos de nitrotirosina**

La determinación de los antígenos de interés fue desarrollada en base al empleo del sistema peroxidasa-antiperoxidasa descrito por Sternberger (Sternberger y col., 1970; Sternberger, 1979).

El tejido fue fijado en PBS (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.6 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.47 mM, NaCl 132.5 mM) y formol 10% durante 24 horas, deshidratado e incluido en parafina. Se realizaron cortes de 6 μm de espesor con un micrótopo tipo Minot. Los cortes fueron desparafinados en xilol y rehidratados con una batería de alcoholes de concentraciones decrecientes. El bloqueo de la actividad de la peroxidasa endógena fue realizado incubando los cortes durante 30 min. con metanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.5%, entre los alcoholes 100% y 90% de la serie de

rehidratación. El bloqueo de los antígenos inespecíficos se realizó incubando los cortes con suero normal de cabra 10% en PBS Tritón X-100 (PBS conteniendo 0.2 % de Triton X-100) durante 1 hora. Concluido el bloqueo se realizó la incubación con el anticuerpo primario monoclonal anti-MMP-2 (dil. 1:40), anti-MMP-9 (dil. 1:500) o anti-residuos de nitrotirosina (dil. 1:1000). Después de 48 hs de incubación a 4 °C, se lavó tres veces con PBS. Luego de los lavados se incubó 1 h con el anticuerpo secundario cabra anti Ig G de ratón (dil. 1:50) y se procedió a repetir los lavados con PBS, se incubó 1 hora con el complejo ratón peroxidasa anti-peroxidasa (dil. 1:100) y se repitieron los lavados con PBS. Todos los anticuerpos utilizados fueron diluidos en PBS conteniendo 0.2 % de Triton X-100. La unión del anticuerpo al antígeno de interés fue revelada con solución reveladora DAB (0.06% 3,3' diamino-benzidina + 0.01 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en buffer Tris salino, pH 7.6) Las secciones del control negativo fueron procesadas omitiendo el anticuerpo primario. Después de la marcación las secciones fueron contrateñidas con hematoxilina y posteriormente deshidratadas y montadas con DPX para su posterior evaluación.

### **Actividad de NADPH diaforasa**

El tejido fue fijado en PBS formol 10% durante 12 horas y mantenido 8 hs en una solución de PBS sacarosa 30% para su criopreservación y conservado a -70 °C hasta su utilización. Se realizaron cortes de 20 µm de espesor mediante crióstato. Los cortes fueron lavados en Tris-HCl (pH 7.6) e incubados durante una hora a 37 °C con solución de reacción (β-NADPH 1 mg/ml, azul de nitro-tetrazolio 0.2 mg/ml y 0.3 % Triton X-100 en 0.1 M de buffer fosfato). Luego de la reacción, las secciones fueron lavadas nuevamente en buffer fosfato 0.1 M, deshidratadas y montadas para su posterior análisis.

### **Análisis de imágenes**

La densidad óptica de las marcas en placentas y fetos procesados para inmunolocalización de los antígenos MMP-2, MMP-9 y residuos de nitrotirosina, así como las evaluadas para actividad diaforasa fueron medidas en un microscopio Axiophot Zeiss con campo claro, equipado con una cámara de captura directa de imagen conectada al programa analizador de imágenes Zeiss Kontron VIDAS. La densidad óptica fue evaluada en un área de  $7.3 \mu\text{m}^2$  en las secciones de placentas y de  $121 \mu\text{m}^2$  en las de fetos, esta evaluación fue realizada 10 veces por campo, tomando 3 campos por sección. Para cada condición experimental se realizó el análisis descrito previamente en 6 secciones, correspondientes cada una a diferentes animales. La resolución de cada píxel fue de 256 niveles de gris.

### **Determinación de proteínas**

La determinación de proteínas de las muestras fue realizada según la técnica descrita por Bradford (Bradford, 1976). Una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  de homogenato o de medio de incubación, según corresponda, fue diluida en 800  $\mu\text{l}$  de solución salina y posteriormente se le adicionó 200  $\mu\text{l}$  de reactivo de Bradford. Luego de 5 min. se determinó la absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 595 nm. Estos valores fueron comparados contra una curva de absorbancia en función de  $\mu\text{g}$  de seroalbúmina bovina por  $\mu\text{l}$  de solución, determinándose de esta manera la cantidad de proteínas totales presentes por  $\mu\text{l}$  de muestra.

### **Detección de la actividad de las MMPs**

La técnica de zimografía fue desarrollada para evaluar la presencia de actividad gelatinolítica de las metaloproteasas. Este valor se correlaciona con la actividad de la enzima (Woessner Jr y Taplin, 1988). Alícuotas de 25  $\mu\text{g}$  de proteínas del sobrenadante

de incubación de las placentas y de 10 µg de proteínas del sobrenadante de incubación de los fetos fueron sometidas a electroforesis en gel de 7.5% SDS-PAGE copolimerizado con 0.1% v/v de gelatina. Luego de la corrida electroforética, los geles fueron lavados en solución de lavado 1 (Trizma base 50 mM + 2.5% v/v de tritón X-100, pH 7.5) por 60 minutos para eliminar el SDS y posteriormente lavados por 3 veces durante 10 min, con solución de lavado 2 (Trizma base 50 mM, pH 7.4). A continuación, los geles fueron incubados en buffer de digestión (50 mM de buffer Tris, pH 7.4 conteniendo: 0.15 mM de ClNa y 30 mM de CaCl<sub>2</sub>) por 18 hs 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. La presencia de MMP-2 y MMP-9 se determinó por el correspondiente peso molecular de las bandas proteolíticas visualizadas, que fue comparado 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 (Sigmagel), tanto con respecto a la superficie como a la intensidad de las bandas, expresándose en unidades densitométricas arbitrarias relativas al control, al que se le asignó valor 1. 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).



### **Niveles de TIMPs**

Los niveles de los TIMPs fueron evaluados por medio de la técnica de zimografía reversa, que se basa en desarrollar una electroforesis en un gel de acrilamida/bis acrilamida que contiene MMPs y gelatina, las gelatinasas son capaces de degradar la matriz proteica del gel excepto en los lugares donde sus inhibidores específicos están presentes (Staskus y col., 1991). Alícuotas de 25 µg y 10 µg de proteínas del sobrenadante de incubación de placentas y fetos respectivamente, fueron sometidas a electroforesis en gel de 12% SDS-PAGE copolimerizado con 0.1% v/v de gelatina y 25 % v/v de medio condicionado de células HT-1080. Luego de la electroforesis los gels fueron lavados en solución de lavado 1 (Trizma base 50 mM + 2.5% v/v de Triton X-100, pH 7.5) por 60 minutos para eliminar el SDS y por 3 veces de 10 min. cada una en solución de lavado 2 (Trizma base 50 mM, pH 7.4). A continuación, los gels fueron incubados en buffer de digestión (50 mM de buffer Tris, pH 7.4, conteniendo 0.15 mM de ClNa y 30 mM de CaCl<sub>2</sub>) por 72 hs. a 37 °C. Luego de la incubación fueron teñidos con solución teñidora (0.5 % de azul de Comassie R250, 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 inhibidora de los TIMPs se evidenció como bandas oscuras en un fondo claro que corresponde a la degradación de la gelatina presente en la matriz del gel por acción de las MMPs del medio condicionado. Los TIMPs fueron identificados por comparación con los marcadores de peso molecular y sus niveles evaluados por densitometría utilizando un programa analizador de imágenes (Sigmagel).

### **Niveles de PPAR $\gamma$**

Las placentas y fetos fueron homogeneizados y luego sonicados durante 10 seg en 500 µl de buffer de lisis (Tris-HCl 20mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1% v/v, cóctel

inhibidor de proteasas 2% v/v, pH 7.4) e incubados a 4 °C por 2 horas. Posteriormente se realizó una centrifugación a 10.000 rpm a 4 °C durante 10 min. recuperándose la fracción soluble para la evaluación de los niveles del receptor mediante la técnica de western blot (Federici y col., 2001). De cada muestra se tomó un volumen equivalente a 100 µg de proteínas y se lo diluyó en buffer muestra 5X (Trizma base 10 mM, SDS 2%, glicerol 10 %, azul de bromofenol 0.06%, β-mercaptoetanol 5%). Antes de la siembra, las muestras fueron sometidas a 100 °C durante 3 min. con el objeto de desnaturalizar las proteínas.

Las muestras fueron sembradas en un gel SDS-PAGE 12% en condiciones desnaturalizantes. Finalizada la electroforesis los geles fueron lavados durante 30 min. 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 de 0.2 µm de tamaño de poro, para ello se utilizó un sistema de transferencia húmedo, en el cual todo el sistema (filtros, membranas y geles) se encuentran sumergidos en el buffer de transferencia durante todo el proceso de la electrotransferencia, el cual se realizó durante 1h a 100 V a 4 °C. Finalizada la transferencia las membranas fueron incubadas durante 16 hs con solución de bloqueo (1% de BSA en TBS: Trizma base 25 mM, NaCl 136.7 mM, KCl 2.68 mM, pH 7.4) y posteriormente 2 hs con el anticuerpo anti-PPAR $\gamma$  policlonal desarrollado en conejo (dil. 1:250) con agitación constante y a temperatura ambiente. Luego de la incubación se realizaron 4 lavados de 10 min. cada uno con TTBS (TBS + 0.05% Tween-20) y 3 lavados de 10 min. cada uno con TBS para eliminar el anticuerpo no unido de manera específica. Finalizados los lavados se incubó la membrana durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti conejo unido a la enzima peroxidasa (dil. 1:4000). Se repitieron los lavados y se procedió al revelado por medio de la técnica de quimioluminiscencia. Las membranas

fueron incubadas en solución reveladora durante 5 min. esta solución está compuesta por luminol y peróxido de hidrógeno. La reacción de la enzima peroxidasa con su sustrato, peróxido de hidrógeno genera la oxidación del luminol el cual a su vez emite luz.

Finalizada la incubación con el reactivo se procedió a realizar una autoradiografía para lo cual la membrana fue puesta en contacto con una placa radiográfica 5 min. en oscuridad. El peso molecular de las bandas fue determinado por medio de la comparación con los estándares de peso molecular y lisado de células pulmonares que expresan el receptor analizado de manera constitutiva (Borlier Mur, 2003). El control negativo fue realizado por omisión del anticuerpo primario. La misma membrana de nitrocelulosa fue sometida a la remoción del anticuerpo primario, incubándola durante 1 h a 50 °C con una solución de Tris 62.5 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM y 2% de SDS, pH 6.2. Luego de este proceso la membrana fue incubada con anticuerpo anti  $\beta$ -actina, como control de carga (Kaufmann y col., 1987).

La reactividad de las bandas fue analizada empleando el programa Sigmagel, tanto con respecto a 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 corregido según la marca correspondiente a la  $\beta$ -actina.

### **Niveles de lipoperóxidos**

Los lipoperóxidos fueron evaluados como sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARs) (Jha y col. 1985), por cuantificación de malondialdehído (MDA), producto de dicha reacción. Por cada muestra, 100 mg de tejido fueron homogeneizados en buffer 100 Tris-HCl mM, pH 7.6. Se adicionó a los homogenatos ácido tricloroacético (40% v/v) y luego se los centrifugó a 3.000 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<sup>-1</sup>.

### **Evaluación de la actividad de la enzima catalasa**

Los tejidos fueron homogeneizados en 500 µl de buffer de homogeneización, pH 7.6 (Tris base 20 mM, EDTA 1 mM, KCl 150 mM, β-mercaptoetanol 1mM, sacarosa 500 mM). Luego, los homogenatos fueron centrifugados a 10.000 rpm por 10 min. a 4 °C y los sobrenadantes fueron almacenados a -70 °C.

La actividad de la enzima catalasa fue evaluada siguiendo el método de Aebi (Aebi, 1984). La mezcla de reacción conteniendo 100 µl de muestra en 3 ml de buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7.2 y 80µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 M, fue evaluada espectrofotométricamente a 240 nm durante 1 min, para determinar la velocidad de descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La actividad de la enzima catalasa fue calculada como el cambio en la densidad óptica que presenta la mezcla de ensayo por minuto por mg de proteínas presentes en la muestra.

### **Evaluación de la actividad de la enzima superóxido dismutasa**

La actividad de la enzima superóxido dismutasa fue ensayada usando el método de Misra and Fridovich (Misra y Fridovich, 1972). Este método está basado en la habilidad de la SOD para inhibir la autooxidación de la epinefrina bajo condiciones específicas. La muestra fue procesada de la misma forma que se describió previamente para la determinación de la actividad de la enzima catalasa. Tres volúmenes diferentes de muestra (10, 15 y 20 µl) fueron adicionados a 3 ml de buffer glicina 50 mM, pH 10.2 conteniendo 1 mM de epinefrina. Los cambios en la absorbancia fueron monitoreados a 480 nm, durante 1 min. Una unidad de SOD fue definida como la cantidad de enzima

requerida para causar el 50% de la inhibición de la autooxidación de la adrenalina. La actividad enzimática fue reportada como unidades por miligramos de proteínas<sup>-1</sup>.

### **Cuantificación de nitratos/nitritos**

Debido a que el óxido nítrico es un agente altamente reactivo y de vida media muy corta, la medición de nitratos/nitritos, metabolitos estables del NO, es empleada como un índice de la producción de este agente a nivel tisular (Baylis y Vallance, 1998a).

Placentas y fetos de ratas sanas y diabéticas fueron homogeneizados en 1000 y 500  $\mu$ l respectivamente de buffer Tris-HCl 100 mM, pH 7.6. Los homogenatos fueron centrifugados a 3.000 rpm durante 15 min a 4 °C y en los sobrenadantes los nitratos se redujeron a nitritos por acción de la enzima nitrato reductasa. Los nitritos totales resultantes fueron cuantificados por el método de Griess (Green y col., 1982) empleando un equipo comercial para su determinación. La densidad óptica fue medida a 540 nm en microplacas, utilizando NaNO<sub>3</sub> y NaNO<sub>2</sub> como estándares. Los resultados fueron expresados en nmoles.mg proteínas<sup>-1</sup>.

### **Determinación de niveles de 15dPGJ<sub>2</sub>**

Para esta determinación se utilizó un equipo comercial que incluye un inmunoensayo competitivo. El equipo presenta un anticuerpo policlonal contra 15dPGJ<sub>2</sub>, que se une de manera competitiva a esta prostaglandina presente en las muestras o a un complejo 15dPGJ<sub>2</sub>-fosfatasa alcalina incluido en el equipo. Se realiza asimismo una curva estándar de concentraciones conocidas de 15dPGJ<sub>2</sub>. Luego de una incubación simultánea, se agrega p-nitrofenil fosfato, el cual reacciona con el complejo anticuerpo-15dPGJ<sub>2</sub>-fosfatasa alcalina, generando un producto coloreado cuya intensidad, determinada en un lector de placas a 405 nm, es inversamente proporcional a la

concentración de 15dPGJ<sub>2</sub> presente en las muestras y en los estándares. Los resultados fueron expresados como pg de 15dPGJ<sub>2</sub>/μg de proteína.

### **Determinaciones estadísticas**

Los resultados de este estudio representan la media y el error estándar. Las comparaciones entre grupos fueron llevadas a cabo, según correspondiera, empleando:  $\chi^2$ , test t-Student y ANOVA y el test de Tukey como complementario, cuando las diferencias encontradas fueron significativas (GraphPad InStat). Las diferencias entre grupos se consideraron significativas cuando p fue menor a 0.05.

---

## ∞ RESULTADOS ∞

### ∞ **CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL MODELO DE DIABETES MODERADA A MEDIADOS DE LA GESTACIÓN** ∞

Los modelos animales nos permiten estudiar en profundidad tanto las vías fisiológicas de eventos normales, como las vías patológicas asociadas con una enfermedad determinada.

En el caso de la diabetes mellitus, la utilización de un modelo de diabetes moderada, que se obtiene al inyectar estreptozotocina en las ratas durante el período neonatal, produce una destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, con posterior regeneración parcial (Portha y col., 1979). Esto da por resultado que el páncreas en el animal adulto desarrolle sus funciones en forma limitada, debido a una menor presencia de células  $\beta$ . De este modo las ratas adultas muestran hiperglucemias moderadas, similares a aquellas frecuentemente presentes en la gestante diabética aún bajo tratamiento, dada la dificultad de realizar un control estricto en esta patología.

Nuestros resultados (Tabla 1) muestran que los valores de glucemia fueron mayores en las ratas gestantes diabéticas por administración neonatal de estreptozotocina ( $210 \pm 18$  mg/dl) en comparación con los animales control ( $100 \pm 10$  mg/dl) ( $p < 0.001$ ). Asimismo, el líquido amniótico obtenido de los animales diabéticos presenta mayores niveles de glucosa que los evaluados en las ratas sanas ( $p < 0.001$ ). En los animales diabéticos se observó un incremento en la tasa de reabsorción embrionaria ( $p < 0.01$ ) y una disminución en la viabilidad fetal ( $p < 0.01$ ) en comparación con los animales control. Sin embargo no se observaron diferencias en relación a los pesos de las placentas y los fetos, cuando se compararon las ratas gestantes diabéticas con el grupo control (Tabla 1).

**TABLA 1:** *Parámetros gestacionales en ratas control y diabéticas a los 13.5 días de preñez*

	<b>Controles</b>	<b>Diabéticas</b>
Glucemia materna (mg/dl)	100 ± 10	215 ± 21***
Niveles de glucosa en el líquido amniótico (mg/dl)	50.33 ± 8.38	145.30 ± 33.85***
Tasa de reabsorción embrionaria (%)	2	12.5**
Tasa de viabilidad fetal (%)	98	94.5
Peso de la placenta (mg)	169.3 ± 6.6	167.6 ± 3.9
Peso del feto (mg)	81.7 ± 2.7	83.0 ± 1.5

Los niveles de glucemia en sangre y líquido amniótico fueron evaluados en 12 muestras provenientes de 8 ratas control y 8 ratas diabéticas. Test estadístico: t-Student. Los datos representan la media ± s.e.m. \*\*\*p<0.001 v control.

Tasa de reabsorciones: N° de embriones reabsorbidos x 100/ N° de embriones implantados. (Se evaluaron 20 ratas control y 20 ratas diabéticas). Tasa de viabilidad fetal: N° de fetos viables (presencia de latido cardíaco) x 100/ N° de embriones desarrollados; \*\*p<0.01 v control. Test estadístico:  $\chi^2$ .

Para la comparación de los pesos de placentas y fetos se evaluaron 24 placentas y 24 fetos procedentes de 8 madres control y 8 madres diabéticas. Test estadístico: t-Student. Los datos representan la media ± s.e.m.



Capítulo I
------------

## ∞ EVALUACIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS EN LA UNIDAD FETO-PLACENTARIA

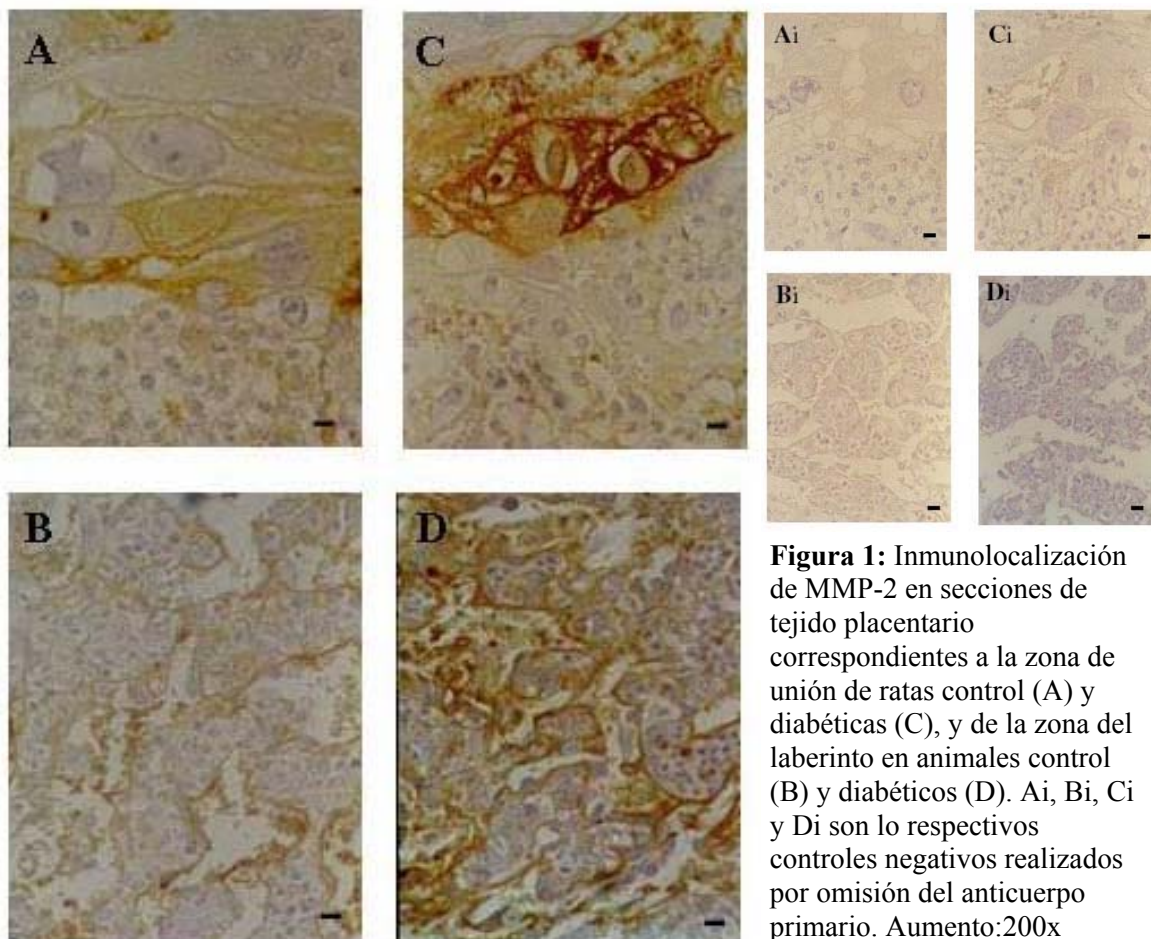
*A partir de la mitad de la gestación la placenta corioalantoidea asume la mayor responsabilidad del desarrollo fetal. La adquisición de una correcta función del órgano placentario está directamente relacionada con el desarrollo y diferenciación de los distintos linajes celulares a partir de la implantación embrionaria. Tanto durante la formación placentaria como en la placenta ya establecida ocurren activos procesos de invasión celular y remodelación tisular. La migración de los espongiotrofoblastos dentro de la decidua materna, así como la remodelación de la matriz extracelular de la decidua requiere de la acción coordinada de enzimas proteolíticas extracelulares. Estas enzimas son además de suma importancia en los procesos de morfogénesis fetal, los cuales están directamente ligados a los eventos de migración, proliferación celular y reestructuración de la matriz extracelular presente en los órganos en desarrollo. Es así como un apropiado balance entre la actividad proteolítica de estas enzimas extracelulares y la acción de sus factores moduladores contribuirá al correcto establecimiento de la irrigación, crecimiento y maduración de los órganos fetales.*

### **Inmunolocalización de las metaloproteinasas placentarias**

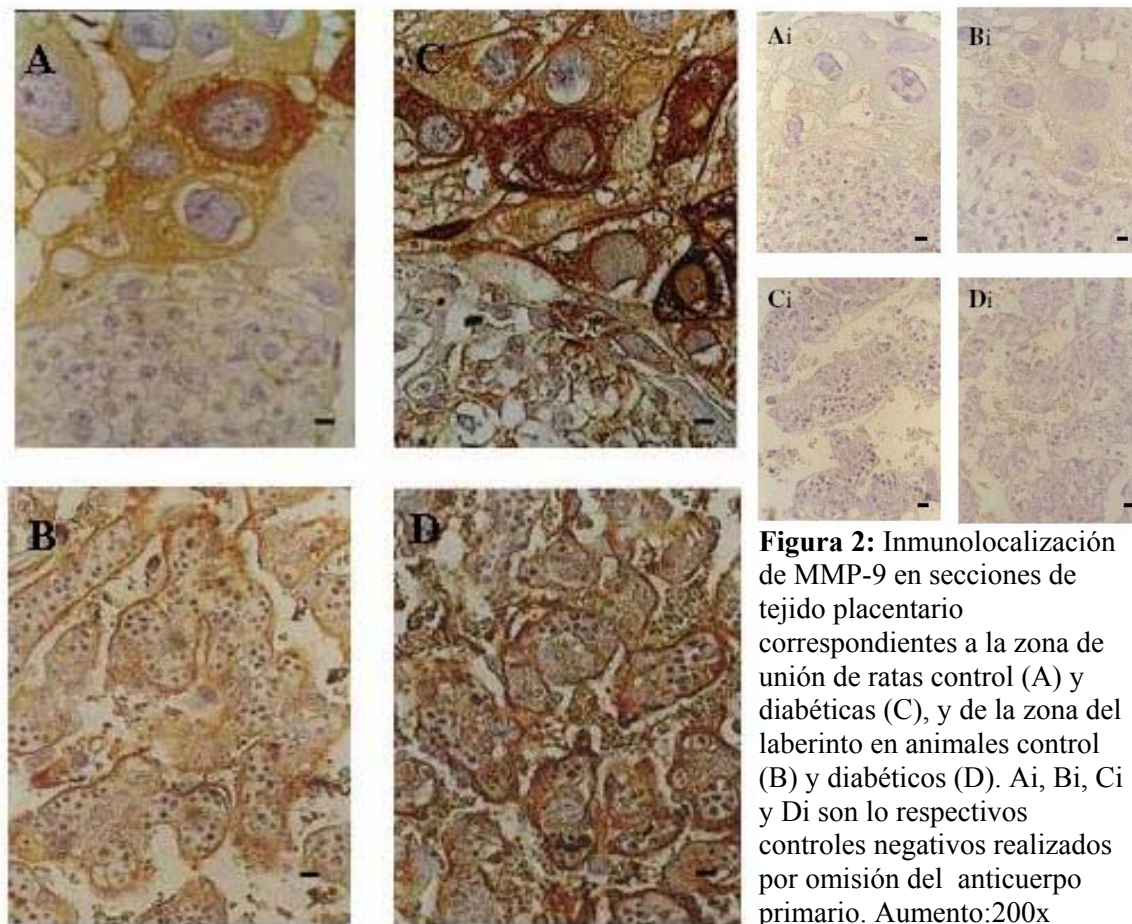
En las placentas de ratas control a los 13.5 días de gestación la expresión de MMP-2 se encontró localizada en las células gigantes del trofoblasto; en este período dichas células se hallan en el límite de la placa placentaria fetal en estrecho contacto con las células deciduales. La marcación de MMP-2 también estuvo presente rodeando las vellosidades que componen el laberinto placentario, sin embargo esta marca no fue tan intensa como la que presentaron las células gigantes del trofoblasto ( $p < 0.001$ ) (Figura 1 A y B; Tabla 2).

De forma similar a MMP-2, la expresión de MMP-9 se encontró localizada en las células gigantes del trofoblasto. La evaluación de la densidad óptica de la inmunomarcación para MMP-9 mostró valores similares a los hallados para MMP-2 en esta zona, mientras que en la zona del laberinto placentario, la densidad de la marca para MMP-9 fue mayor que la correspondiente a MMP-2 ( $p < 0.001$ ) (Figura 2 A y B, Tabla 2).

En la placenta de los animales diabéticos, ambas MMPs presentaron una distribución similar a la encontrada en las placentas de las ratas control, pero la inmunoreactividad fue mayor para MMP-2 ( $p < 0.001$ ) y para MMP-9 ( $p < 0.001$ ) tanto en la zona de unión (Figura 1C y 2C) como en la zona del laberinto (Figura 1D y 2D) (Tabla 2).



**Figura 1:** Inmunolocalización de MMP-2 en secciones de tejido placentario correspondientes a la zona de unión de ratas control (A) y diabéticas (C), y de la zona del laberinto en animales control (B) y diabéticos (D). Ai, Bi, Ci y Di son los respectivos controles negativos realizados por omisión del anticuerpo primario. Aumento:200x



**Figura 2:** Inmunolocalización de MMP-9 en secciones de tejido placentario correspondientes a la zona de unión de ratas control (A) y diabéticas (C), y de la zona del laberinto en animales control (B) y diabéticos (D). Ai, Bi, Ci y Di son los respectivos controles negativos realizados por omisión del anticuerpo primario. Aumento:200x

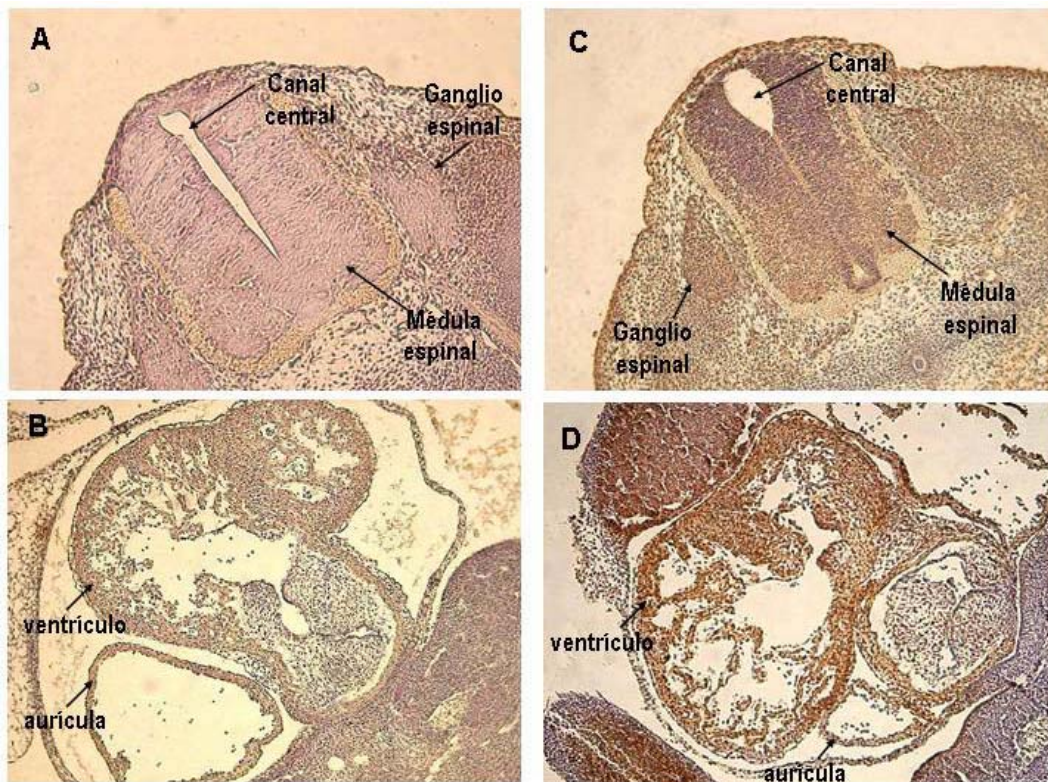
**Tabla 2:** Análisis de la densidad óptica de MMP-2 y MMP-9 en la placenta de ratas control y diabéticas

	Control		Diabético	
	<i>Laberinto</i>	<i>Zona de unión</i>	<i>Laberinto</i>	<i>Zona de unión</i>
<b>MMP-2</b> (D.O.)	0.321 ± 0.005 <sup>abc</sup>	0.352 ± 0.006 <sup>ad</sup>	0.398 ± 0.005 <sup>c</sup>	0.410 ± 0.005 <sup>d</sup>
<b>MMP-9</b> (D.O.)	0.380 ± 0.004 <sup>be</sup>	0.365 ± 0.005 <sup>f</sup>	0.420 ± 0.006 <sup>e</sup>	0.430 ± 0.006 <sup>f</sup>

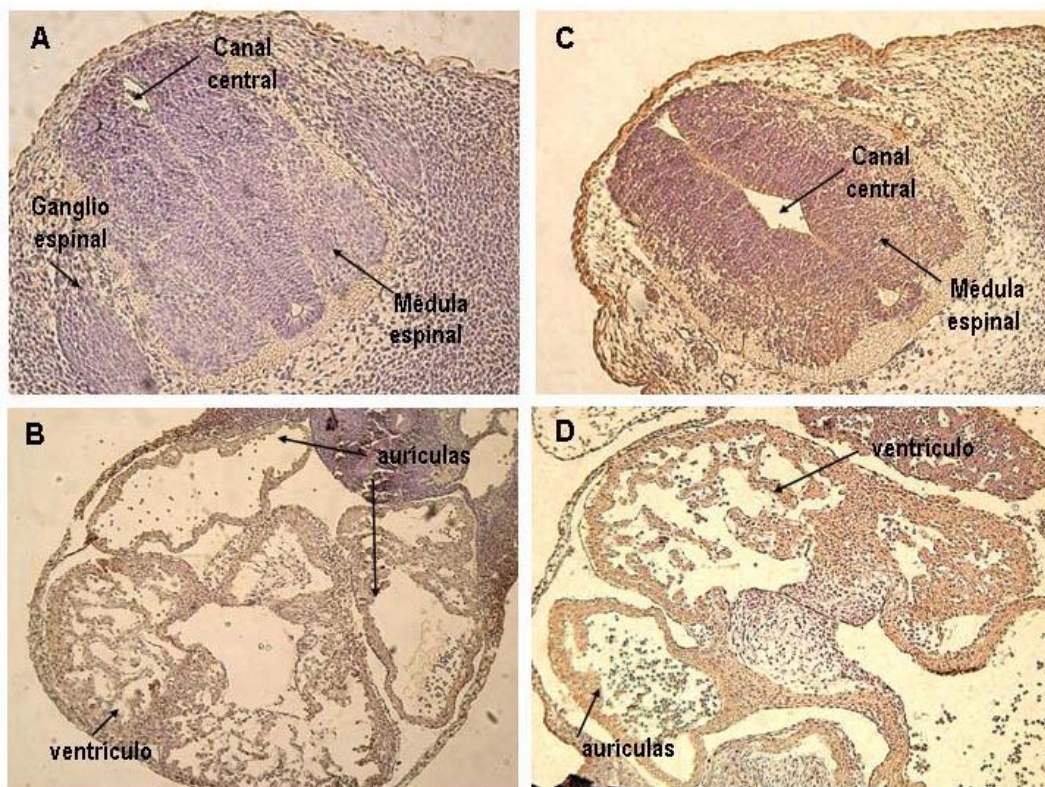
El análisis de la densidad óptica (D.O.) fue realizado 10 veces en cada campo perteneciente a una sección placentaria, 3 campos al azar fueron evaluados por sección. Para cada condición experimental se realizó el análisis descrito previamente en 6 secciones, correspondientes cada una, a diferentes animales. Los subíndices indican los pares que presentaron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ). Test estadístico: ANOVA

### **Inmunolocalización de las metaloproteinasas fetales**

En los fetos de día 13.5 de gestación la expresión de MMP-2 y MMP-9 fue analizada por medio de la técnica de inmunohistoquímica. Los fetos de madres control mostraron expresión de MMP-2 y MMP-9 en la médula espinal y el corazón de las regiones torácicas evaluadas (Figura 3 A y B; 4 A y B). La marcación de MMP-2 y MMP-9 se encontró incrementada en la región espinal ( $p < 0.001$ ) y cardíaca ( $p < 0.001$  y  $p < 0.05$ , para las respectivas MMPs) de los fetos procedentes de madres diabéticas en comparación con los fetos control (Figura 3 C y D; 4 C y D) (Tabla 3).



**Figura 3:** Inmunolocalización de MMP-2 en secciones torácicas fetales. (A) Médula de fetos procedentes de ratas control, (C) Médula de fetos procedentes de ratas diabéticas, (B) Región cardíaca de fetos procedentes de ratas control, (D) Región cardíaca de fetos procedentes de ratas diabéticas. Aumento: 160x

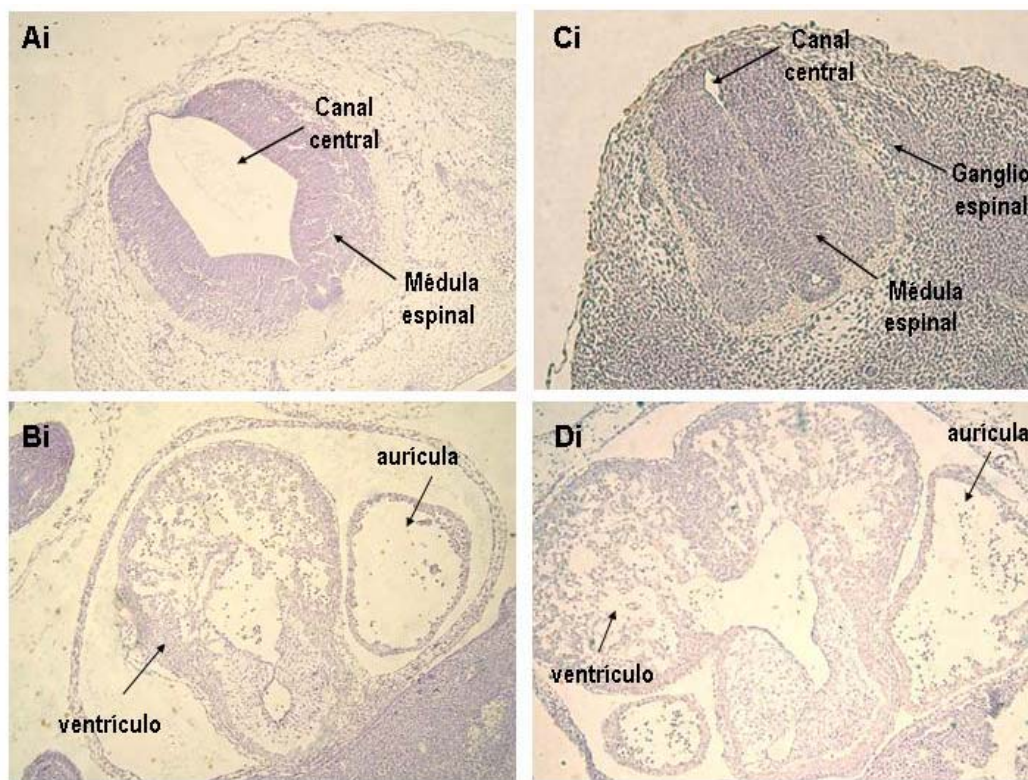


**Figura 4:** Inmunolocalización de MMP-9 en secciones torácicas fetales. (A) Médula de fetos procedentes de ratas control, (C) Médula de fetos procedentes de ratas diabéticas, (B) Región cardíaca de fetos procedentes de ratas control, (D) Región cardíaca de fetos procedentes de ratas diabéticas. Aumento: 160x

**Tabla 3:** Análisis de la densidad óptica de MMP-2 y MMP-9 en los fetos de ratas control y diabéticas

	Control		Diabético	
	Médula espinal	Corazón	Médula espinal	Corazón
<b>MMP-2</b> (D.O.)	$0.168 \pm 0.004^a$	$0.178 \pm 0.005^b$	$0.252 \pm 0.009^a$	$0.266 \pm 0.018^b$
<b>MMP-9</b> (D.O.)	$0.175 \pm 0.006^c$	$0.182 \pm 0.006^d$	$0.237 \pm 0.009^c$	$0.228 \pm 0.008^d$

La densidad óptica (D.O.) fue realizada evaluando 10 veces cada campo perteneciente a una sección fetal, 3 campos al azar fueron evaluados por sección. Para cada condición experimental se realizó el análisis descrito previamente en 6 secciones, correspondientes cada una, a diferentes animales. Los subíndices indican los pares que presentaron diferencias significativas (<sup>d</sup> $p < 0.05$ ; <sup>a,b,c</sup> $p < 0.001$ ). Test estadístico: ANOVA.



**Figura 5:** Controles negativos de inmunolocalización se realizados por omisión del anticuerpo primario. Secciones torácicas fetales. (Ai) Médula de fetos procedentes de ratas control, (Bi) Médula de fetos procedentes de ratas diabéticas, (Ci) Corazón de fetos procedentes de ratas control, (Di) Corazón de fetos procedentes de ratas diabéticas. Aumento: 160x

Estos resultados indican que MMP-2 y MMP-9 se encuentran presentes en la placentas y fetos de ratas control, y que la expresión de ambas MMPs está incrementada en la unidad feto placentaria de ratas diabéticas. Dado estos hallazgos, fue de interés evaluar a continuación, si este incremento visualizado en la expresión de MMP-2 y MMP-9, se correspondía con un aumento en la actividad de las mismas, ya que los efectos biológicos de las metaloproteinasas se hallan vinculados con las proteasas activas.

### **Actividad de metaloproteinasas en la placenta**

Los análisis zimográficos de las MMPs placentarias revelaron que la actividad de MMP-2 y MMP-9 y de sus correspondientes zimógenos proMMP-2 y proMMP-9 es diferente en la placa placentaria materna y la placa placentaria fetal de los animales control. Si

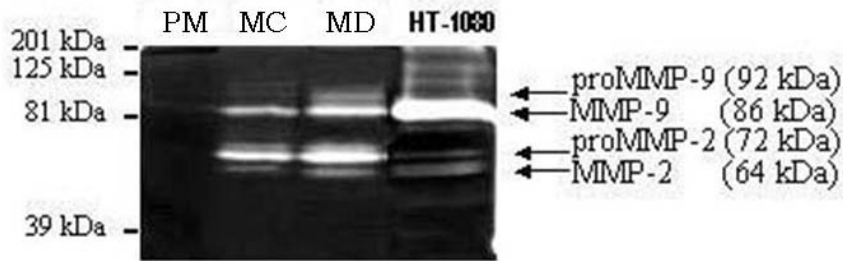
bien las proenzimas no son activas, se pueden visualizar en la zimografía por acción del SDS incorporado en el gel, de esta manera es posible evaluar los niveles de proenzima presentes en el medio extracelular y disponibles para una rápida activación.

ProMMP-2 (72 KDa) y proMMP-9 (92 KDa) se hallaron presentes tanto en la placa placentaria materna como la placa fetal placentaria, siendo mayor la presencia de proMMP-2 en comparación con proMMP-9 en ambas placas ( $p < 0.01$ ) (Figuras 6, 7, 9 y 10).

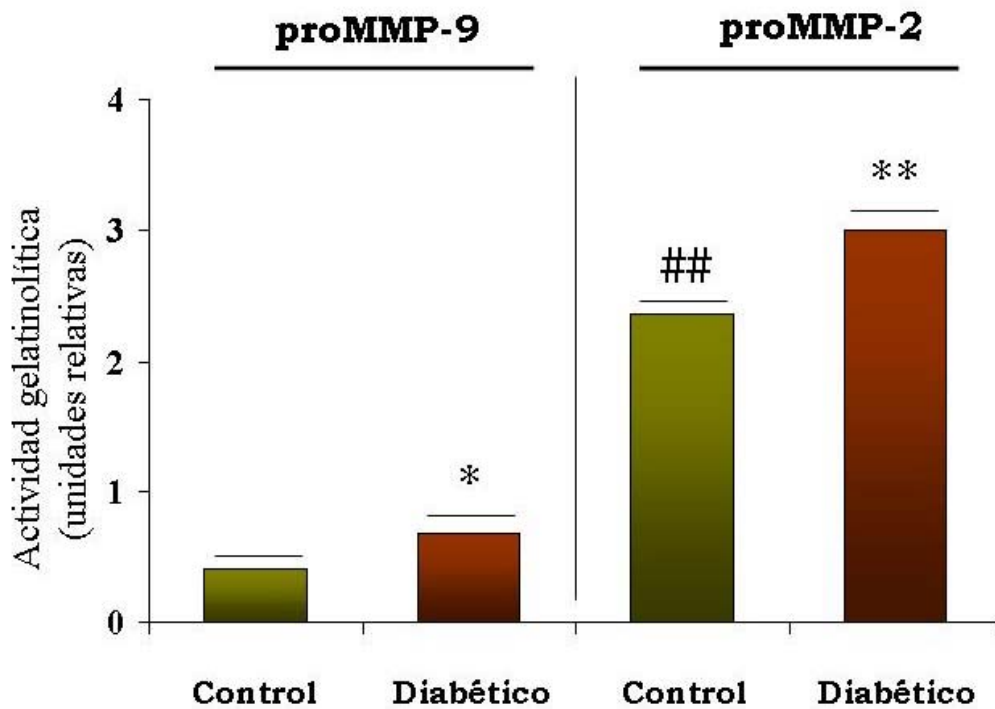
La placa placentaria materna presentó actividad para MMP-2 (66 kDa) y MMP-9 (86 kDa), siendo mayor la de esta última ( $p < 0.01$ ) (Figuras 6 y 8), mientras que el componente fetal placentario solo mostró actividad para MMP-9. (Figuras 9 y 11).

El mismo estudio realizado en las placentas de los animales diabéticos, mostró que la placa placentaria materna presenta mayores niveles de proMMP-2 ( $p < 0.01$ ) y de proMMP-9 ( $p < 0.05$ ) que el tejido control (Figuras 6, 7, 9 y 10). Asimismo, la actividad de MMP-2 y de MMP-9 fue significativamente más alta que en placa placentaria materna de las ratas sanas ( $p < 0.01$  y  $p < 0.005$  respectivamente) (Figuras 6 y 8).

El análisis de la actividad de las MMPs en el componente placentario de origen fetal de los animales diabéticos, mostró un incremento en los niveles de proMMP-2 ( $p < 0.01$ ) y de proMMP-9 ( $p < 0.05$ ) en relación al control (Figuras 9 y 10). Al mismo tiempo, la actividad de MMP-9 presentó un aumento significativo ( $p < 0.005$ ) y se observó la aparición de la actividad de MMP-2, ausente en el tejido de animales sanos (Figuras 9 y 11).

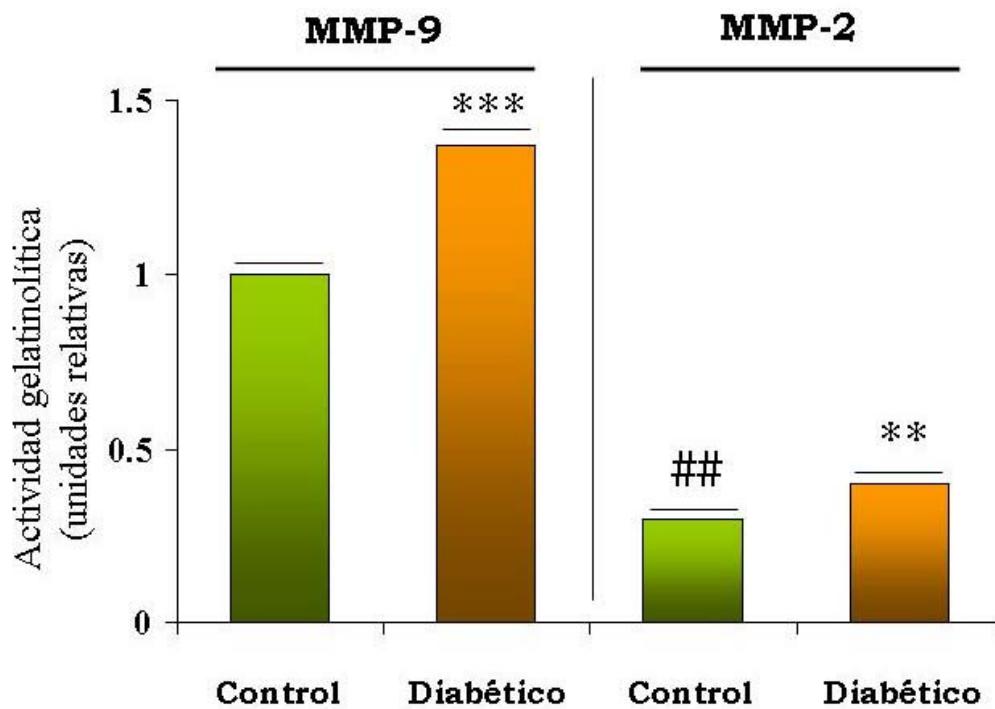


**Figura 6:** Zimograma representativo de la actividad de las MMPs en la placa placentaria materna. La actividad gelatinolítica de las MMPs se evidencia como bandas claras de lisis. MC: placa placentaria materna de ratas control; MD: placa placentaria materna de ratas diabéticas. ProMMP-9 (92 kDa, forma latente); MMP-9 (86 kDa, forma activa); proMMP-2 (72 kDa; forma latente); MMP-2 (64 kDa, forma activa). Los marcadores de peso molecular son indicados como PM. El medio condicionado de HT-1080 (línea celular de fibrosarcoma humano) fue usado como control positivo.

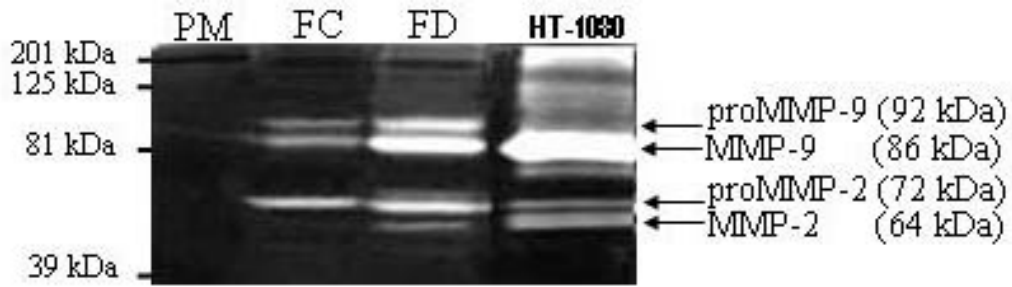


**Figura 7:** Evaluación de la actividad gelatinolítica de las proenzimas MMP-2 y MMP-9 en la placa placentaria materna de ratas control y diabéticas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=7 en cada grupo). ##p<0.01 comparado con proMMP-9 control. \*p<0.05 y \*\*p<0.01 comparado con sus respectivos controles. Test estadístico: ANOVA.

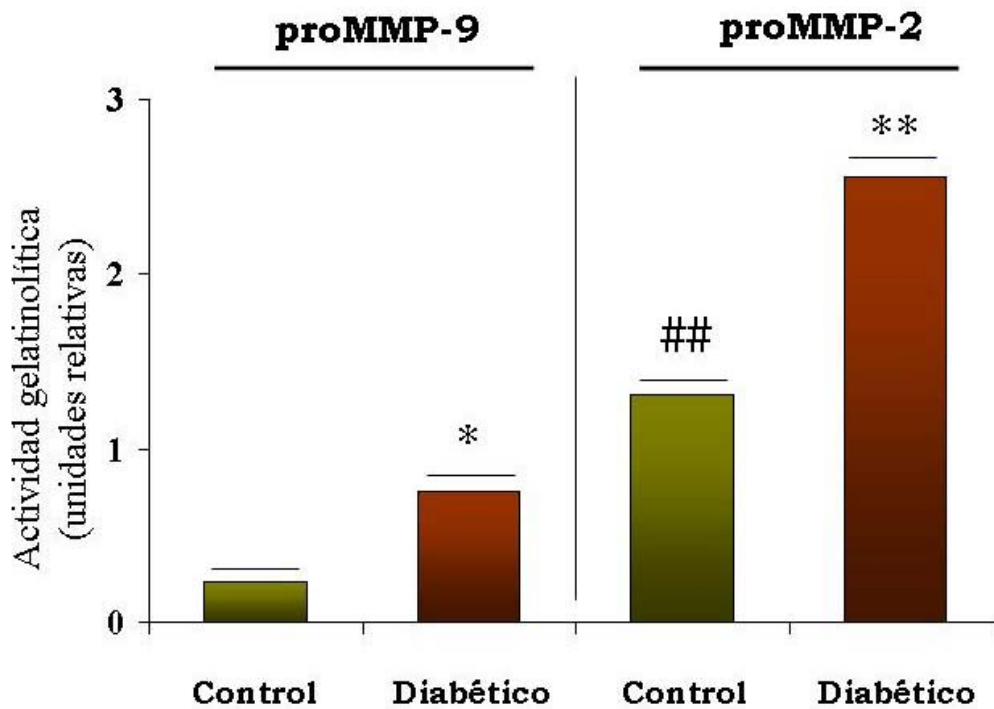




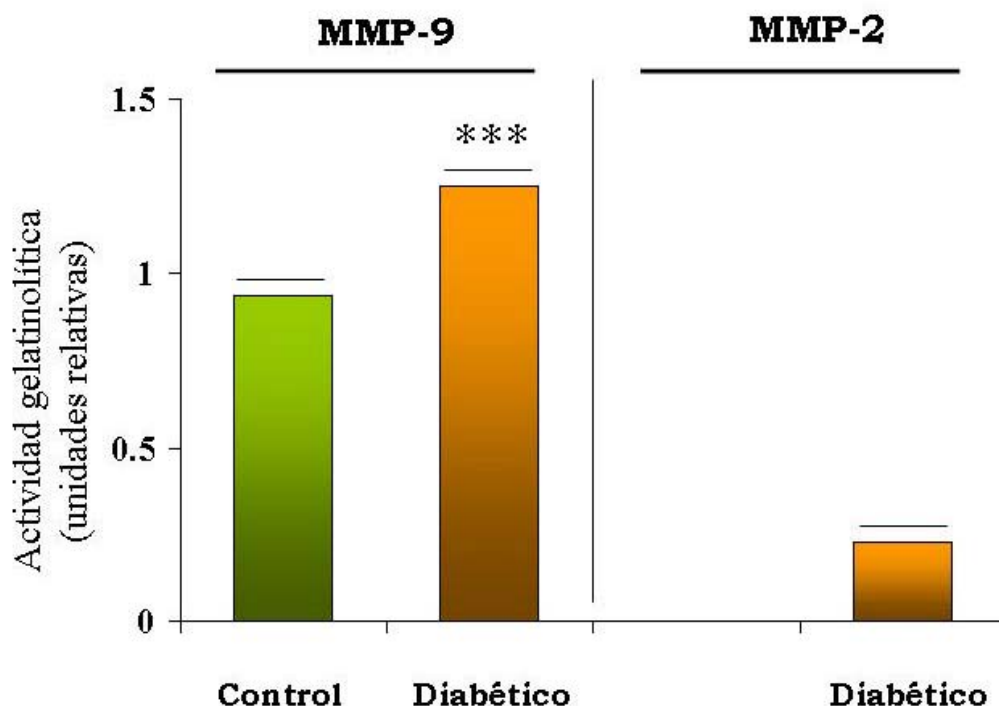
**Figura 8:** Evaluación de la actividad gelatinolítica de las enzimas MMP-2 y MMP-9 en la placa placentaria materna de ratas control y diabéticas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=7 en cada grupo). ##p<0.01 comparado con la actividad de MMP-9 control. \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.005 comparado con sus respectivos controles. Test estadístico: ANOVA.



**Figura 9:** Zimograma representativo de la actividad de las MMPs en la placa placentaria fetal. FC: placa placentaria fetal de animales control; FD: placa placentaria fetal de ratas diabéticas. ProMMP-9 (92 kDa, forma latente); MMP-9 (86 kDa, forma activa); proMMP-2 (72 kDa; forma latente); MMP-2 (64 kDa, forma activa). Nótese la ausencia de la banda correspondiente a MMP-2 en FC. Los marcadores de peso molecular son indicados como PM. El medio condicionado de HT-1080 (línea celular de fibrosarcoma humano) fue usado como control positivo.



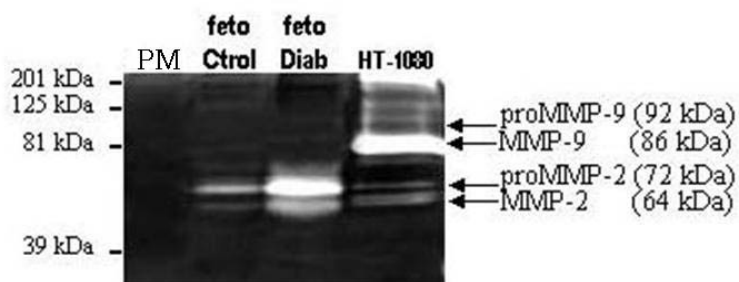
**Figura 10:** Evaluación de la actividad gelatinolítica de las proenzimas MMP-2 y MMP-9 en la placa placentaria fetal de ratas control y diabéticas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=7 en cada grupo). ##p<0.01 comparado con proMMP-9 control. \*p<0.05 y \*\*p<0.01 comparado con sus respectivos controles. Test estadístico: ANOVA.



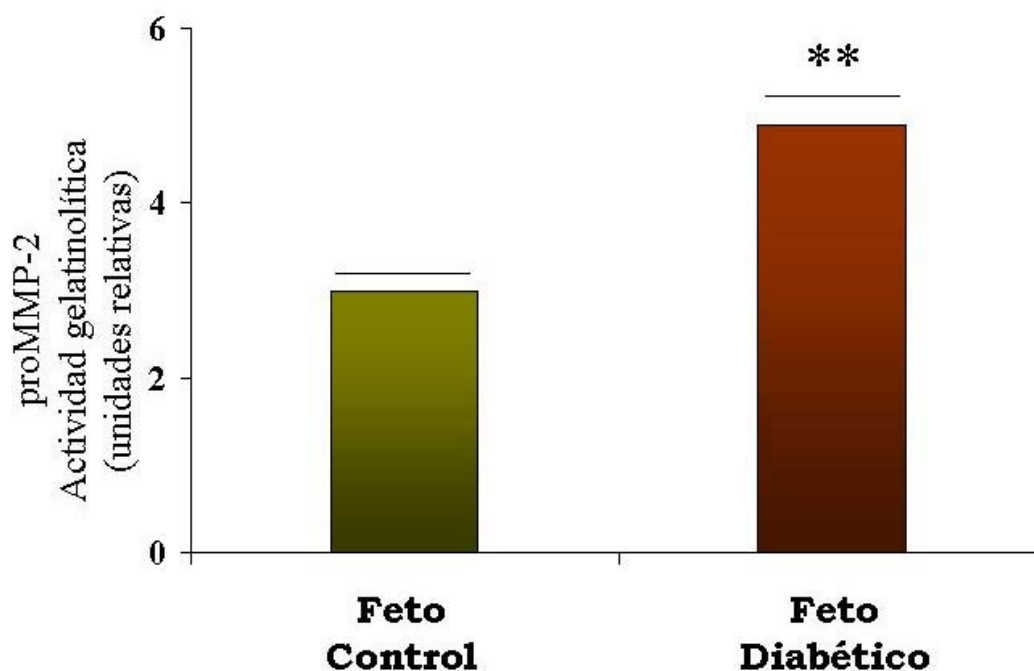
**Figura 11:** Evaluación de la actividad gelatinolítica de las enzimas MMP-2 y MMP-9 en la placa placentaria materna de ratas control y diabéticas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=7 en cada grupo). \*\*\* $p < 0.005$  v control. Nótese la ausencia de actividad de MMP-2 en la placa placentaria fetal de los animales control. Test estadístico: t-Student.

### **Actividad de metaloproteinasas en el feto**

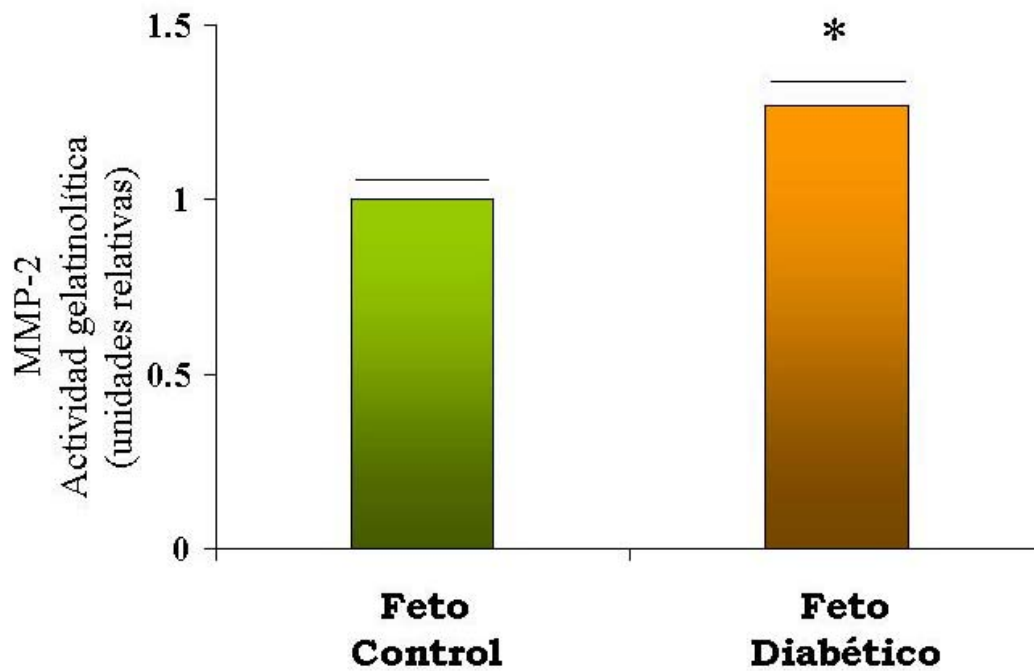
Con el propósito de evaluar el impacto originado por las alteraciones en la actividad de las MMPs placentarias de los animales diabéticos sobre el feto, se realizó el estudio de la actividad de las metaloproteinasas fetales presentes en el día 13.5 de gestación. Nuestros datos revelan que en este estadio los fetos procedentes de ratas sanas no muestran actividad para proMMP-9 ó MMP-9 (Figura 12). Igual característica fue identificada en los fetos procedentes de madres diabéticas, pero éstos presentaron mayor actividad gelatinolítica tanto para proMMP-2 ( $p < 0.01$ ) como para MMP-2 ( $p < 0.05$ ) en relación a los fetos de ratas sanas (Figura 13 y 14).



**Figura 12:** Zimograma representativo de la actividad de las MMPs en el feto. Feto Ctrol: Feto procedente de madre control; Feto Diab: Feto procedente de madre diabética. ProMMP-9 (92 kDa, forma latente); MMP-9 (86 kDa, forma activa); proMMP-2 (72 kDa; forma latente); MMP-2 (64 kDa, forma activa). Nótese la ausencia de las bandas correspondientes a proMMP-9 y MMP-9 en ambos grupos. Los marcadores de peso molecular son indicados como PM. Medio condicionado de una línea celular de fibrosarcoma humano (HT-1080) fue usado como control positivo.



**Figura 13:** Evaluación de la actividad gelatinolítica de la proenzima MMP-2 en los fetos de madres control (Feto Control) y en los fetos de madres diabéticas (Feto Diabético). Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=7 en cada grupo). \*\*p<0.01 v control. Test estadístico: t-Student.



**Figura 14:** Evaluación de la actividad gelatinolítica de la enzima MMP-2 en los fetos de madres control (Feto Control) y en los fetos de madres diabéticas (Feto Diabético). Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=7 en cada grupo). \*p<0.05 v control. Test estadístico: t-Student.

Capítulo II
-------------

∞ REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS  
METALOPROTEINASAS POR ACCIÓN DE LAS ESPECIES  
REACTIVAS DEL OXIGENO EN LA UNIDAD FETO-  
PLACENTARIA

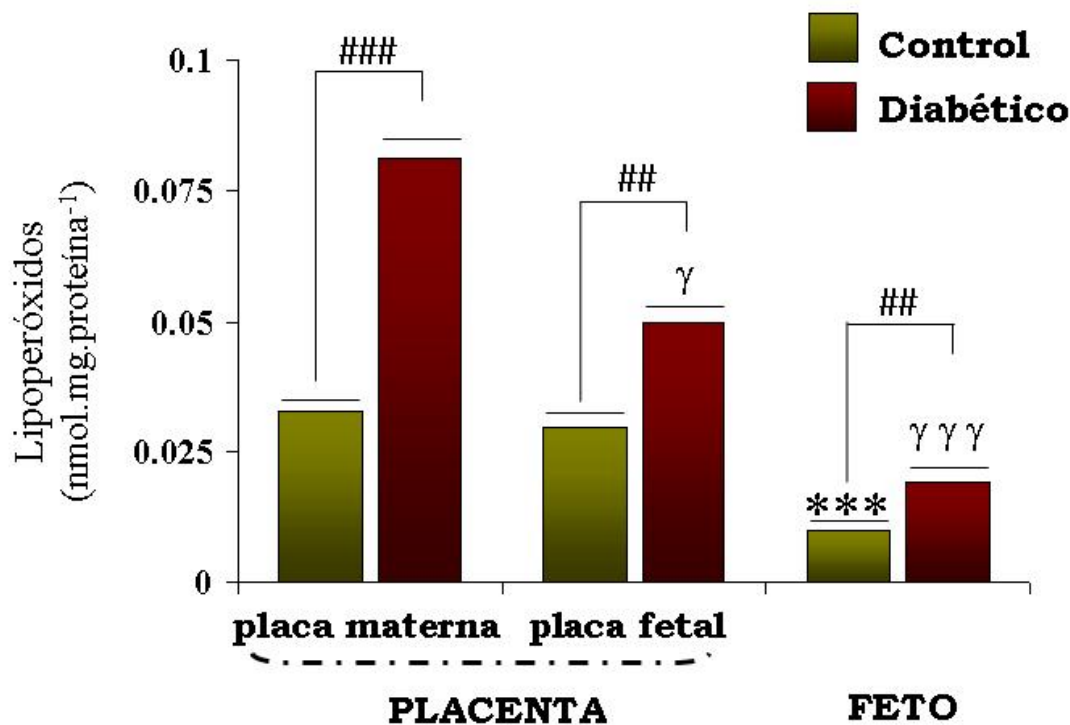
**Balance oxidativo en la unidad feto-placentaria de ratas control y diabéticas**

El balance oxidativo fue analizado en la unidad feto placentaria, evaluando el daño producido por las especies oxidantes a través de la cuantificación de los niveles de TBARs y de la capacidad antioxidante, valorando la actividad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa.

**Niveles de lipoperóxidos**

La evaluación de los niveles de lipoperóxidos en la unidad feto placentaria del animal sano, mostró que no hay diferencias en los valores de TBARs entre las placas placentarias materna y fetal. Sin embargo los niveles de peroxidación lipídica fueron significativamente menores en el feto comparado con ambas placas placentarias ( $p < 0.001$ ).

En la unidad feto placentaria de animales diabéticos los valores de lipoperóxidos se encontraron incrementados en la placa placentaria materna ( $p < 0.005$ ), en la placa placentaria fetal ( $p < 0.02$ ) y en el feto de rata diabética ( $p < 0.02$ ) en comparación con sus respectivos controles. Este incremento en el estrés oxidativo, representado por el aumento en los valores de TBARs, exhibe un interesante patrón descendente desde las placas componentes de la placenta hacia el feto, siendo los niveles de lipoperóxidos mayores en la placa placentaria materna diabética en relación con la placa placentaria fetal ( $p < 0.05$ ) y con el feto ( $p < 0.001$ ) (Figura 15).

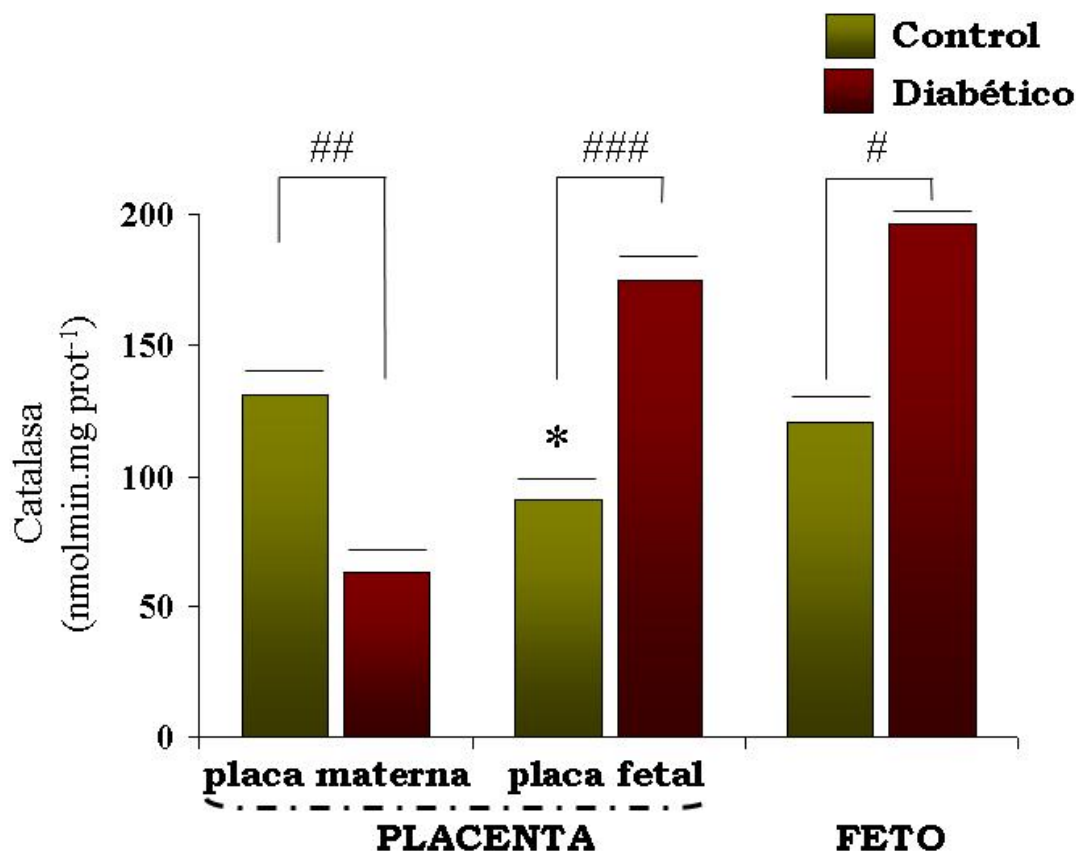


**Figura 15:** Niveles de lipoperóxidos en las placas materna y fetal (componentes de la placenta) y en el feto de ratas gestantes control y diabéticas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=7). \*\*\*p< 0.001 en fetos de ratas diabéticas  $\nu$  placa placentaria materna control; ##p<0.02 y ###p<0.005 en tejidos de animales diabéticos  $\nu$  sus respectivos controles;  $\gamma$ p<0.05 y  $\gamma\gamma\gamma$ p<0.001 en tejidos de ratas diabéticas  $\nu$  placa placentaria materna diabética. Test estadístico: ANOVA.

### Actividad de la enzima catalasa

La actividad de la enzima catalasa fue evaluada por medio de la capacidad que presenta el homogenato, procedente de las muestras, de catalizar la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por unidad de tiempo. En los animales sanos la placa placentaria materna presentó una disminución en la actividad de la enzima en comparación con la placa placentaria fetal (p<0.05). Mientras que la placa materna de la placenta de los animales diabéticos mostró una importante disminución de la actividad de la catalasa (p<0.005) en comparación con su correspondiente control. De manera diferente, la placa placentaria de origen fetal de los animales diabéticos presentó un marcado incremento de la actividad de esta enzima

( $p < 0.001$ ) al igual que lo observado para los fetos de madres diabéticas en comparación con sus respectivos controles ( $p < 0.02$ ) (Figura 16).



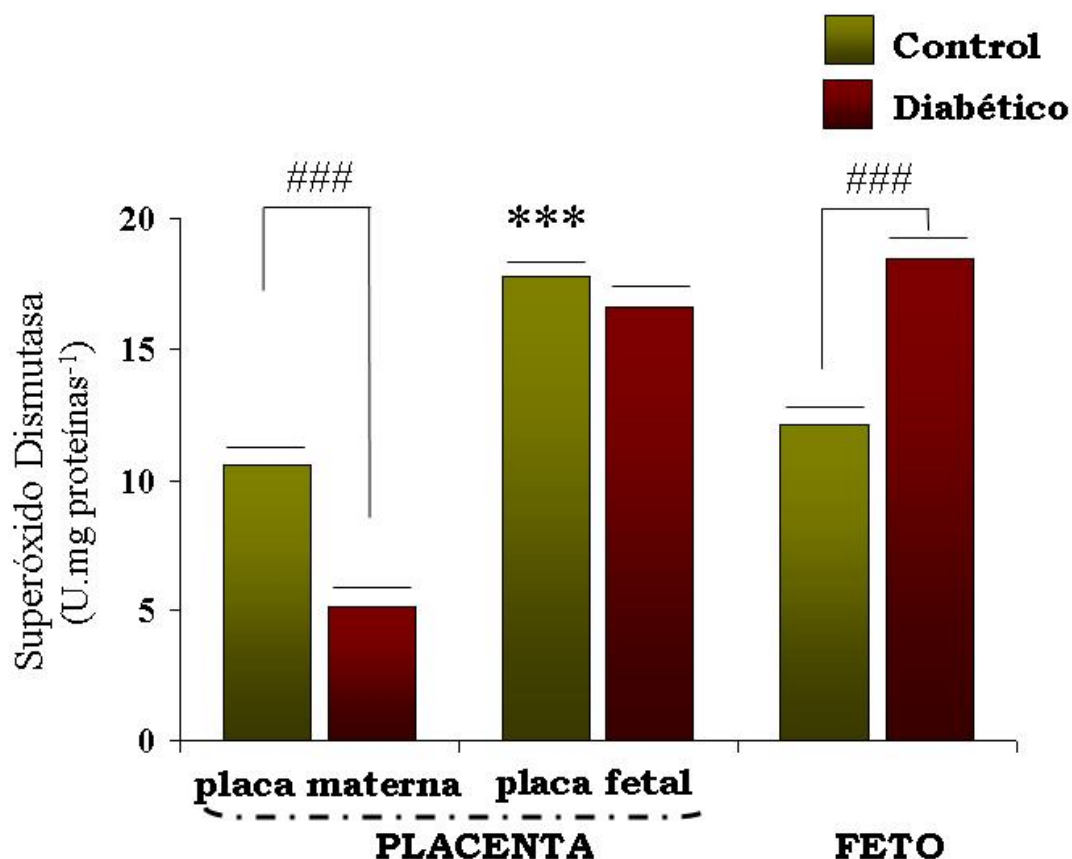
**Figura 16:** Actividad de la enzima catalasa en las placas, materna y fetal (componentes de la placenta) y en el feto de ratas gestantes controles y diabéticas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM, ( $n = 6-7$ ). \* $p < 0.05$  en la placa placentaria fetal  $\nu$  placa placentaria materna del grupo control # $p < 0.02$ , ## $p < 0.005$  y #### $p < 0.001$   $\nu$  sus respectivos controles. Test estadístico: ANOVA.

### **Actividad de la enzima superóxido dismutasa**

La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) fue estudiada en las placas componentes del órgano placentario de los animales control, resultando mayor en la placa placentaria fetal en comparación con la placa placentaria materna ( $p < 0.001$ ). La diabetes materna indujo cambios en el órgano placentario, donde la actividad SOD fue menor en la placa placentaria materna de los animales diabéticos en relación con la placa



placentaria materna control ( $p < 0.001$ ), no presentando diferencias en cuanto a la actividad de la enzima en la placa placentaria fetal diabética. En el feto, la actividad SOD resultó incrementada en los embriones procedentes de madres diabéticas en comparación con los fetos de ratas sanas ( $p < 0.001$ ) (Figura 17).



**Figura 17:** Actividad de la enzima superóxido dismutasa evaluada en la placa placentaria materna y fetal, y en el feto procedente de animales control y diabéticos. Los datos representan las medias  $\pm$  SEM, (n=6). \*\*\* $p < 0.001$  en la placa placentaria de ratas diabéticas  $\nu$  placa placentaria del grupo control. ### $p < 0.001$  en tejidos de animales diabéticos  $\nu$  sus respectivos controles. Test estadístico: ANOVA.

### **Regulación de la actividad de MMP-2 y MMP-9 por las especies reactivas del oxígeno en la unidad feto-placentaria de ratas control y diabéticas**

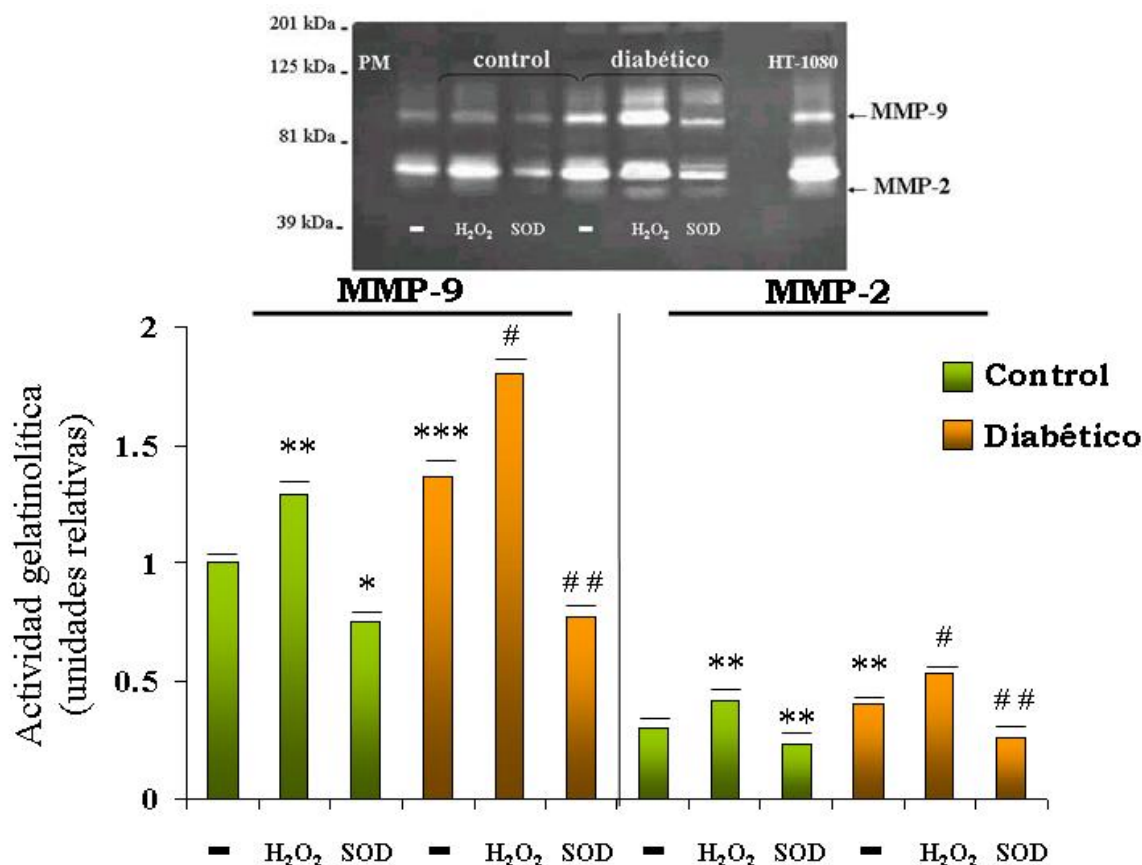
Dado que las especies reactivas del oxígeno son inductoras del pasaje de la forma inactiva a la forma activa de las MMPs en varios tejidos (Gu y col., 2002; Pustovrh y

col., 2000 y 2002; Jian y Rosenberg, 2005), fue de interés evaluar si este camino directo de activación se encuentra presente en la unidad feto-placentaria. Para esto se adicionó peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ; 50  $\mu M$ ) como agente oxidante, y superóxido dismutasa (SOD; 1000U/ml) como enzima capturadora de especies reactivas de oxígeno, al medio de incubación de los tejidos placentarios y fetales. El posterior análisis de la actividad de las MMPs mostró que en la placa placentaria materna del grupo control la adición de  $H_2O_2$  fue capaz de incrementar la actividad de MMP-9 y de MMP-2 ( $p < 0.01$ ) en comparación con aquella evaluada en el tejido incubado sin adiciones. Este incremento en la actividad de MMP-9 y MMP-2 fue también observado en la placa placentaria materna de los animales diabéticos ( $p < 0.05$  v diabético sin adición).

De forma inversa la presencia en el medio de incubación de la enzima SOD produjo una disminución en la actividad de MMP-9 y MMP-2 tanto en la placa placentaria materna de animales control ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  respectivamente) como en la placa placentaria materna de ratas diabéticas ( $p < 0.01$ ) comparadas con sus respectivos controles sin adiciones (Figura 18).

Resultados diferentes fueron encontrados cuando se evaluó la actividad de MMP-9 y MMP-2 en la placa placentaria fetal de animales controles y diabéticos. En estos tejidos, la alteración del estado redox por la adición de  $H_2O_2$  o de la enzima superóxido dismutasa al medio de incubación no fue capaz de modificar la actividad de las metaloproteinasas evaluadas (Figura 19).

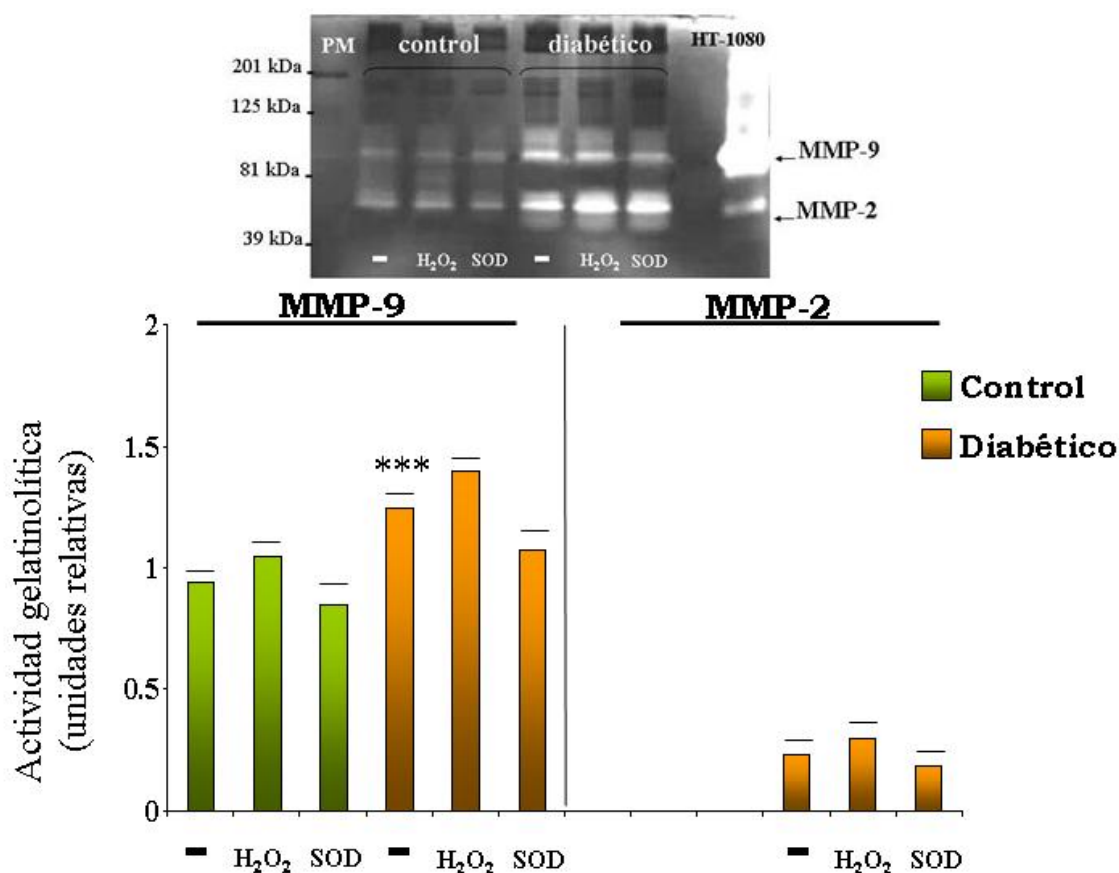
El mismo estudio fue llevado a cabo para evaluar la modulación de las especies reactivas del oxígeno sobre la actividad de la MMP-2 fetal. La adición de  $H_2O_2$  produjo un incremento en la actividad de esta proteasa tanto en los fetos del grupo control como en los provenientes de animales diabéticos ( $p < 0.01$ ) comparados con los fetos incubados sin adiciones. Por otra parte la presencia de SOD en el medio de incubación causó una reducción de la actividad gelatinolítica de MMP-2 en los fetos de animales control y diabéticos ( $p < 0.05$ ) comparados con los fetos incubados sin adiciones (Figura 20).



**Figura 18:** Regulación de la actividad de MMP-2 y MMP-9 por acción de las ROS, en la placa placentaria materna de ratas control y diabéticas.

Zimograma representativo mostrando la actividad gelatinolítica en la placa placentaria materna de animales control y diabéticos *i*) sin adición, representado en la figura como (-); *ii*) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μM); *iii*) SOD (1000 U/ml). Los pesos moleculares son indicados en la primera calle del zimograma (PM). Medio condicionado de células HT-1080 (células de fibrosarcoma humano) fue usado como control positivo.

El gráfico muestra el análisis densitométrico de la actividad de las MMPs en la placa placentaria materna de ratas controles y diabéticas *i*) sin adición, representado en la figura como (-); *ii*) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μM); *iii*) con SOD (1000 U/ml). Los datos representan la media ± SEM, (n=8). \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.005 v control sin adición, #p<0.05 y ##p<0.01 v diabético sin adición. Test estadístico: ANOVA.



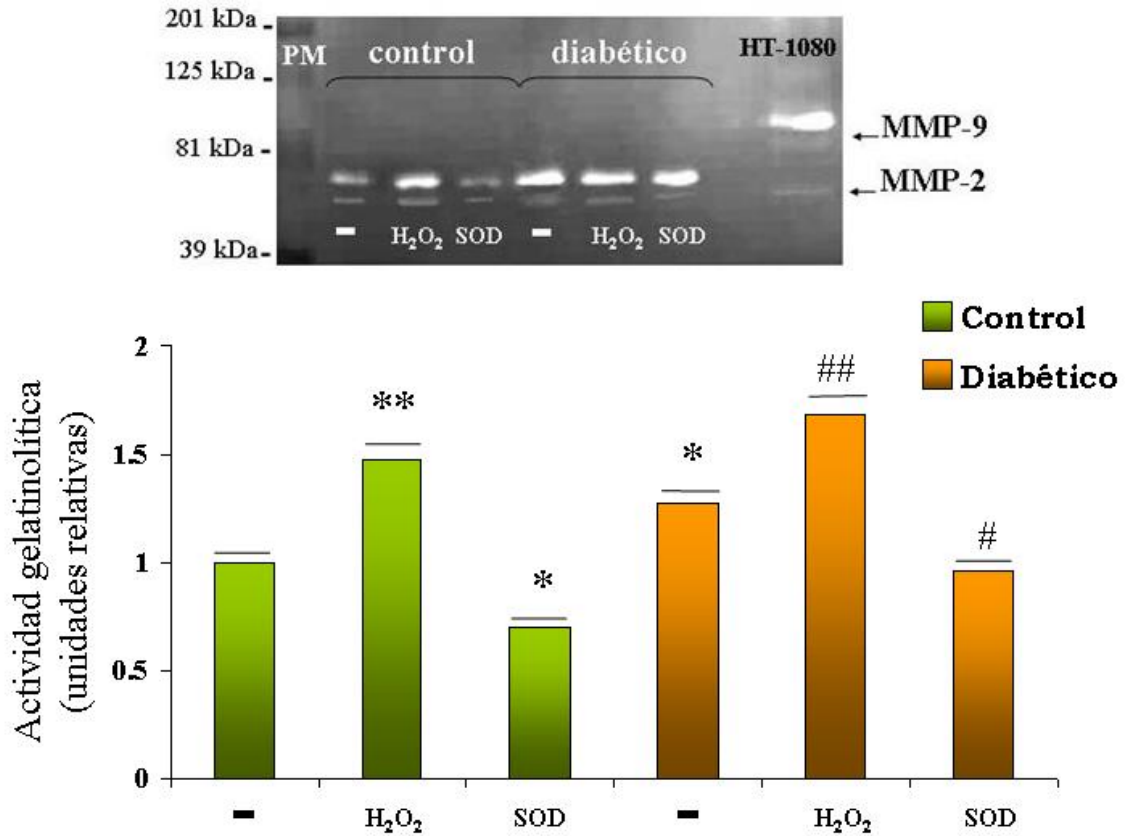
**Figura 19:** Regulación de la actividad de MMP-2 y MMP-9 por acción de las ROS, en la placa placentaria fetal de ratas control y diabéticas.

Zimograma representativo mostrando la actividad gelatinolítica en la placa placentaria fetal de animales controles y diabéticos *i*) sin adición, representado en la figura como

(-); *ii*) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μM); *iii*) con SOD (1000 U/ml). Los pesos moleculares son indicados en la primera calle del zimograma (PM). Medio condicionado de células HT-1080 (células de fibrosarcoma humano) fue usado como control positivo.

El gráfico muestra el análisis densitométrico de la actividad de las MMPs en la placa placentaria fetal de ratas controles y diabéticas *i*) sin adición, representado en la figura como (-); *ii*) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μM); *iii*) con SOD (1000 U/ml). Los datos representan la media ± SEM, (n=8).

\*\*\*p<0.005 v control sin adición. Test estadístico: ANOVA.



**Figura 20:** Regulación de la actividad de MMP-2 por acción de las ROS, en los fetos de ratas controles y diabéticas.

Zimograma representativo mostrando la actividad gelatinolítica de MMP-2 en los fetos procedentes de animales controles y diabéticos *i*) sin adición, representado en la figura como (-); *ii*) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μM); *iii*) con SOD (1000 U/ml). Los pesos moleculares son indicados en la primera calle del zimograma (PM). Medio condicionado de células HT-1080 (células de fibrosarcoma humano) fue usado como control positivo.

El gráfico muestra el análisis densitométrico de la actividad de MMP-2 en los fetos de ratas controles y diabéticas *i*) sin adición, representado en la figura como (-); *ii*) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (50 μM); *iii*) con SOD (1000 U/ml). Los datos representan la media ± SEM, (n=8). \*p<0.05 y \*\*p<0.01 v control sin adición, #p<0.05 y ##p<0.01 v diabético sin adición. Test estadístico: ANOVA.

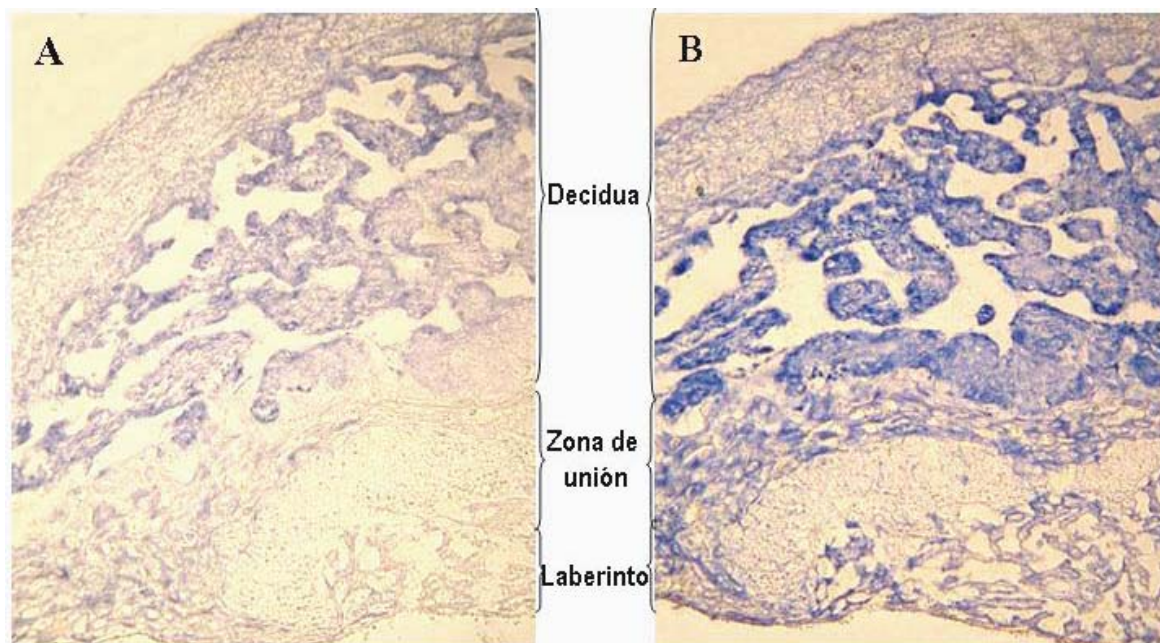
<u>Capítulo III</u>
---------------------

∞ REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS  
METALOPROTEINASAS POR ACCIÓN DEL OXIDO NITRICO EN LA  
UNIDAD FETO-PLACENTARIA

**Localización de NADPH-diaforasa**

La evaluación de la enzima oxido nítrico sintasa (NOS) se realizó empleando la reacción histoquímica de NADPH-diaforasa. Esta técnica permite conocer en manera simultánea la localización tisular de la enzima y su grado de activación (Vincent y Kimura, 1992; DellaCorte y col., 1995; Morris y col., 1997). El análisis de NADPH-diaforasa en la placenta de los animales control mostró que la enzima se encuentra presente en las tres zonas que componen la placenta, decidua (placa materna placentaria), zona de unión y el laberinto (componentes de la placa fetal placentaria) (Figura 21 A). Las placentas diabéticas presentaron un marcado incremento en la actividad NADPH-diaforasa ( $p < 0.001$ ), siendo esta actividad localizada en las mismas zonas que las placentas control (Figura 21 B) (Tabla 4).

La evaluación de NADPH-diaforasa en cortes procedentes de la región torácica fetal de animales controles mostró actividad de la enzima en la médula espinal, en los ganglios espinales y en el ventrículo cardíaco (Figura 22 A y B). Mientras que los mismos tejidos de la región torácica de fetos de ratas diabéticas presentaron un marcado incremento en la actividad NADPH-diaforasa en comparación con los controles ( $p < 0.001$ ), siendo mayor este aumento para la región cardíaca comparada con la región torácica de dichos animales ( $p < 0.001$ ) (22 C y D) (Tabla 5).

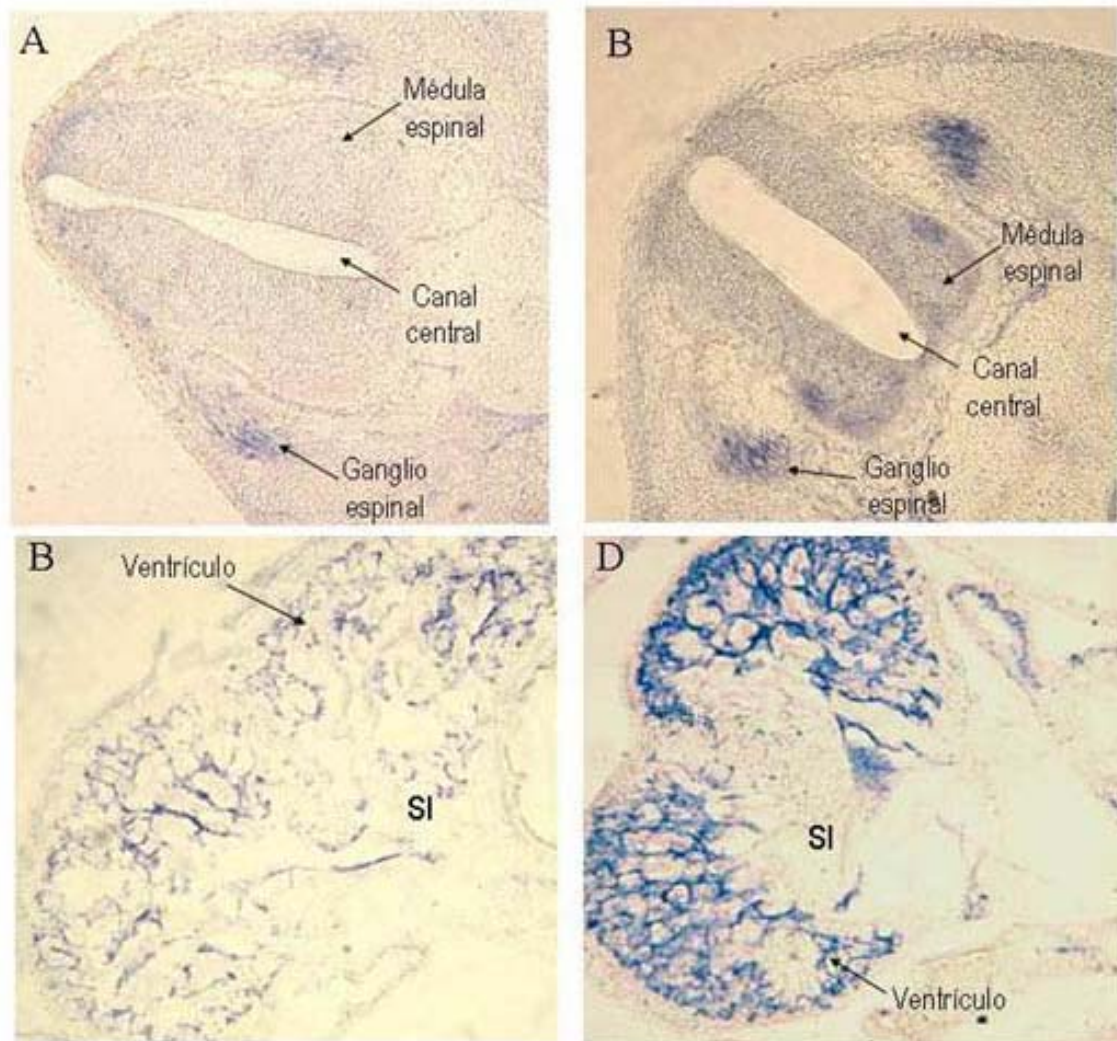


**Figura 21:** Actividad NADPH-diaforasa en: (A) placenta de ratas control y (B) placenta de ratas diabéticas. La actividad de la enzima fue evaluada por medio de la reacción histoquímica con de NADPH diaforasa empleando azul de tetrazolio. Aumento: 50x

**Tabla 4:** *Análisis de la densidad óptica de NADPH diaforasa en las placentas de ratas control y diabéticas*

	<b>Placenta</b>	
	<b>Control</b>	<b>Diabético</b>
<b>NADPH-d</b> (D.O.)	0.079 ±0.006	0.133±0.009 ***

La evaluación de la densidad óptica (D.O.) fue realizada 10 veces en cada campo perteneciente a una sección placentaria, 3 campos al azar fueron evaluados por sección. Para cada condición experimental se realizó el análisis descrito previamente en 6 secciones, correspondientes cada una, a diferentes animales. \*\*\* $p < 0.001$ . Test estadístico: t-Student.



**Figura 22:** Microfotografía en la que la actividad para la NADPH diaforasa se evidencia con la reacción del azul de tetrazolio. (A) Médula espinal fetal control, (B) Médula espinal fetal diabética, (C) Corazón de feto control y (D) Corazón de feto diabético. SI: Septum intermedio. Aumento: 200x



**Tabla 5:** *Análisis de la densidad óptica de NADPH diaforasa en los fetos de ratas control y diabéticas*

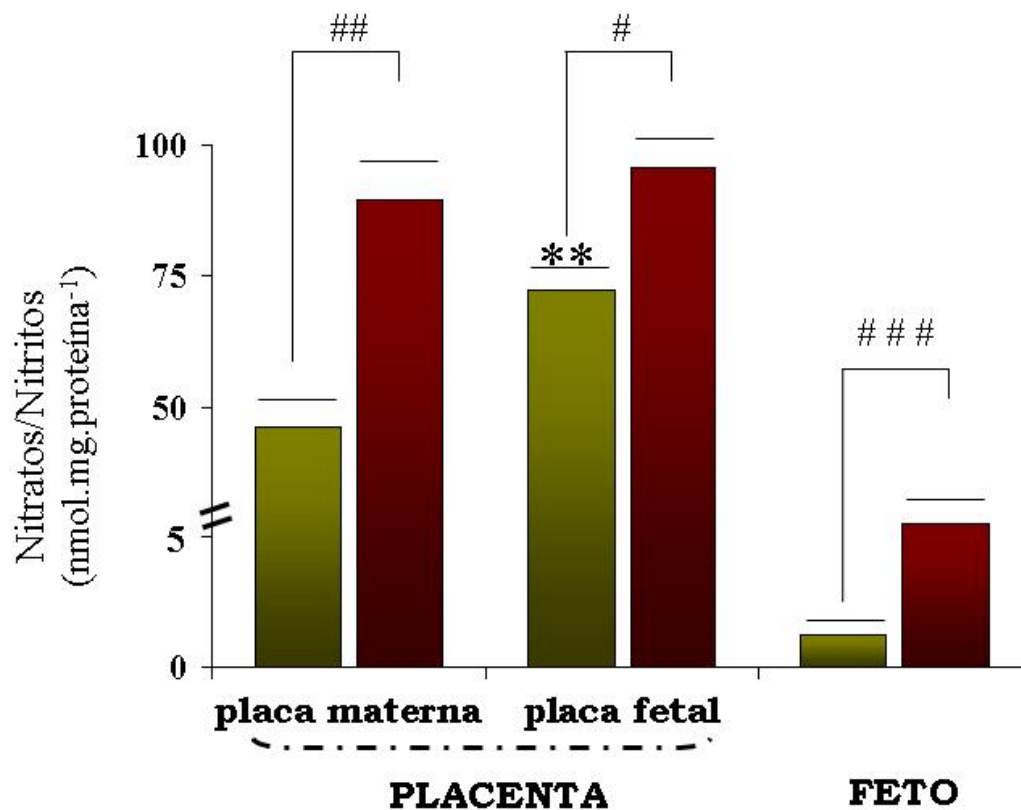
	<b>FETO</b>			
	<b>Control</b>		<b>Diabético</b>	
	<i>Médula espinal</i>	<i>Corazón</i>	<i>Médula espinal</i>	<i>Corazón</i>
<b>NADPH-d</b> (D.O.)	0.073 ± 0.004 <sup>a</sup>	0.079 ± 0.005 <sup>b</sup>	0.165 ± 0.007 <sup>ac</sup>	0.207 ± 0.006 <sup>bc</sup>

La densidad óptica fue evaluada (D.O.) realizando mediciones 10 en cada campo perteneciente a una sección fetal, 3 campos al azar fueron evaluados por sección. Para cada condición experimental se realizó el análisis descrito previamente en 6 secciones, correspondientes cada una, a diferentes animales. Los subíndices indican los pares que presentaron diferencias significativas ( $p < 0.001$ ). Test estadístico: ANOVA.

### **Evaluación de los niveles de nitratos/nitritos**

La concentración de nitratos/nitritos, productos estables del metabolismo final del NO, fue evaluada en la placentas y en los fetos de ratas controles y diabéticas a los 13.5 días de preñez (Figura 23). En la placenta de las ratas control, los valores de nitratos/nitritos de la placa materna fueron menores que los hallados en la placa placentaria fetal ( $p < 0.01$ ). En cuanto a la placenta diabética, no se hallaron diferencias entre los valores de nitratos/nitritos de ambas caras. Nuestros resultados muestran asimismo que los niveles de nitratos/nitritos de las placentas diabéticas son apreciablemente mayores que en los tejidos del grupo control, tanto en la placa materna como en la placa fetal ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$ , respectivamente).

Los niveles fetales de nitratos/nitritos fueron mayores en el grupo de de ratas diabéticas que aquellos que provenían de ratas control ( $p < 0.005$ ).

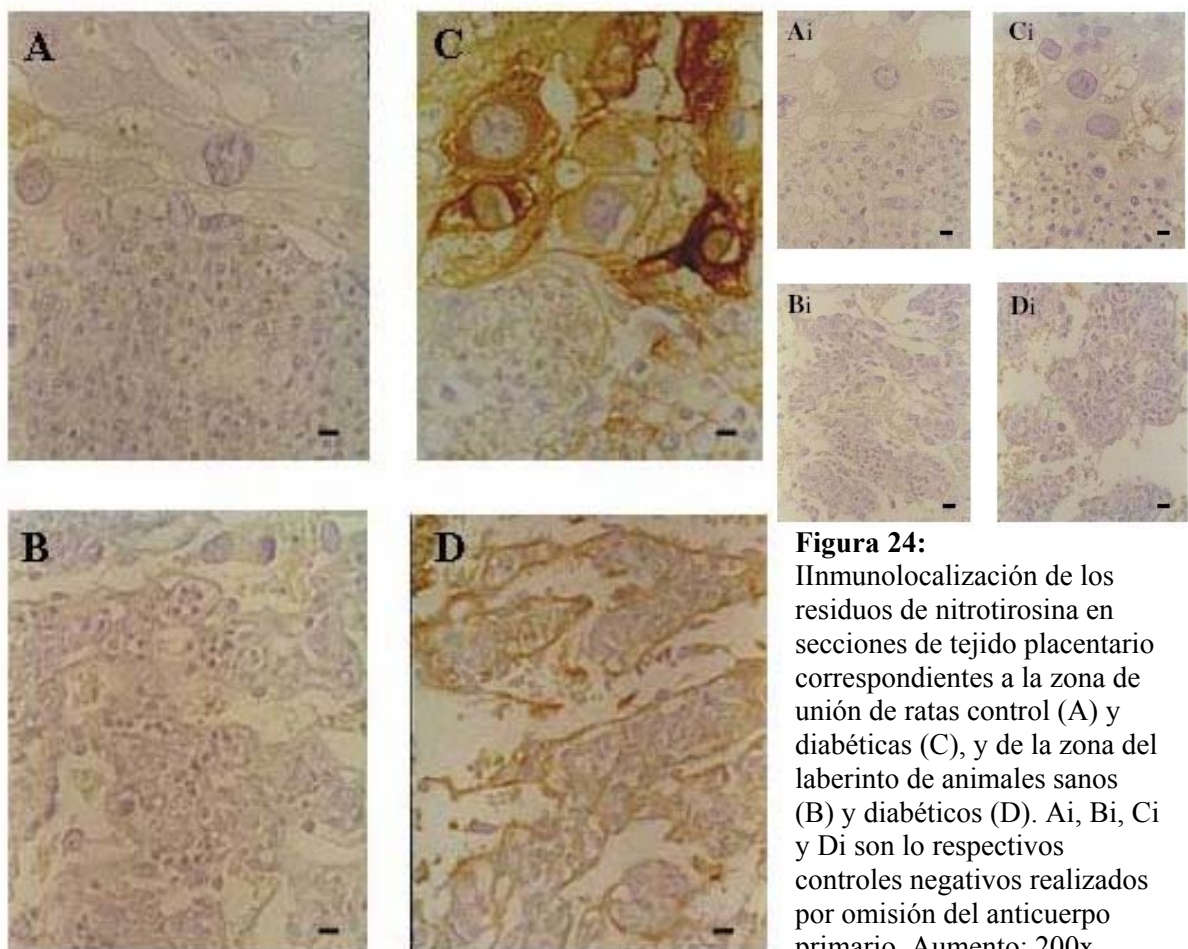


**Figura 23:** Concentración de nitratos/nitritos, metabolitos estables de NO, en las placas placentarias y en los fetos de ratas control y diabéticas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=7-8). \*\*p<0.01 comparado con la placa materna control, #p<0.05, ##p<0.01 y ###p<0.005 v sus respectivos controles. Test estadístico: ANOVA.

### **Inmunolocalización de los residuos de nitrotirosina en la placenta de ratas control y diabéticas**

Ha resultado de interés evaluar la presencia de residuos de nitrotirosina en los tejidos estudiados, dado el incremento en la actividad de la NADPH diaforasa, los altos niveles de nitratos/nitritos y el aumento de los lipoperóxidos observados en las placentas y fetos de animales diabéticos. Estos parámetros reflejan la existencia de altos niveles de NO y ROS, compuestos que a su vez se combinan para producir peroxinitritos. La presencia de residuos de nitrotirosina son indicadores a su vez del daño producido por los peroxinitritos en los residuos aminoacídicos de las proteínas tisulares.

La inmunolocalización de los residuos de nitrotirosina presentó una débil marca en la zona de unión, así como en el laberinto de las placentas de los animales control, mientras que se observó una fuerte y generalizada inmunoreactividad en las células gigantes del trofoblasto de la zona de unión y en las células del laberinto placentario de los animales diabéticos ( $p < 0.001$ ) (Figura 24 y Tabla 6). El análisis de los residuos de nitrotirosina en las secciones fetales realizadas a nivel torácico, mostraron resultados similares a los obtenidos en las placentas. Así, la inmunomarcación de los residuos de nitrotirosina presentó una marcada inmunoreactividad en la médula y el corazón de los fetos procedentes de ratas diabéticas mientras que sólo algunas células aisladas presentaron marcación para residuos de nitrotirosina en los fetos procedentes de animales control ( $p < 0.001$ ) (Figura 25) (Tabla 7).

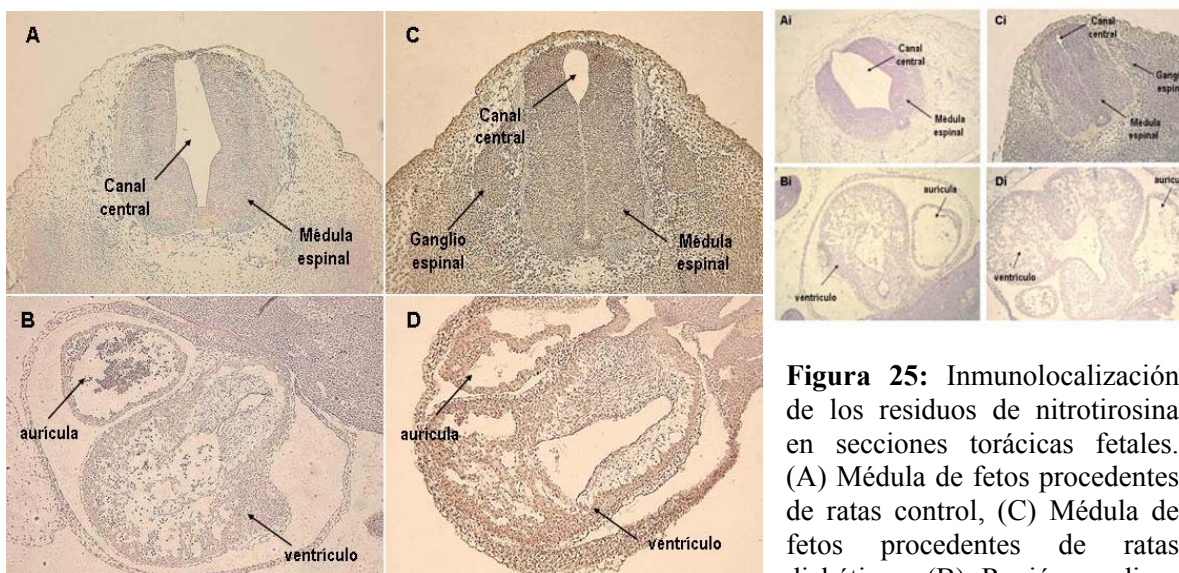


**Figura 24:** Inmunolocalización de los residuos de nitrotirosina en secciones de tejido placentario correspondientes a la zona de unión de ratas control (A) y diabéticas (C), y de la zona del laberinto de animales sanos (B) y diabéticos (D). Ai, Bi, Ci y Di son los respectivos controles negativos realizados por omisión del anticuerpo primario. Aumento: 200x

**Tabla 6:** Análisis de la densidad óptica de los residuos de nitrotirosina en las placentas de ratas control y diabéticas

	Control		Diabético	
	Laberinto	Zona de unión	Laberinto	Zona de unión
<b>NT (D.O.)</b>	0.194 ± 0.002	0.187 ± 0.002	0.296 ± 0.009***	0.353 ± 0.055***

La evaluación de la densidad óptica (D.O.) de los residuos de nitrotirosina (NT), fue realizada 10 veces en cada campo perteneciente a una sección placentaria, 3 campos al azar fueron evaluados por sección. Para cada condición experimental se realizó el análisis descrito previamente en 6 secciones, correspondientes cada una, a diferentes animales. \*\*\*p<0.001. Test estadístico: ANOVA.



**Figura 25:** Inmunolocalización de los residuos de nitrotirosina en secciones torácicas fetales. (A) Médula de fetos procedentes de ratas control, (C) Médula de fetos procedentes de ratas diabéticas, (B) Región cardiaca de fetos procedentes de ratas control, (D) Región cardiaca de fetos procedentes de ratas diabéticas. Ai, Bi, Ci y Di son los respectivos controles negativos realizados por omisión del anticuerpo primario. Aumento: 160x

de fetos procedentes de ratas control, (D) Región cardiaca de fetos procedentes de ratas diabéticas. Ai, Bi, Ci y Di son los respectivos controles negativos realizados por omisión del anticuerpo primario. Aumento: 160x

**Tabla 7:** *Análisis de la densidad óptica de los residuos de nitrotirosina en los fetos de ratas control y diabéticas*

	<b>Control</b>		<b>Diabético</b>	
	<i>Médula espinal</i>	<i>Corazón</i>	<i>Médula espinal</i>	<i>Corazón</i>
<b>NT</b> (D.O.)	0.148 ± 0.003	0.130 ± 0.005	0.203 ± 0.006***	0.180 ± 0.008***

La evaluación de la densidad óptica (D.O.) de los residuos de nitrotirosina (NT), fue realizada 10 veces en cada campo perteneciente a una sección fetal, 3 campos al azar fueron evaluados por sección. Para cada condición experimental se realizó el análisis descrito previamente en 6 secciones, correspondientes cada una, a diferentes animales. \*\*\*p<0.001. Test estadístico: ANOVA.

### **Regulación de la actividad de MMP-2 y MMP-9 por el óxido nítrico en la unidad feto-placentaria de ratas control y diabéticas**

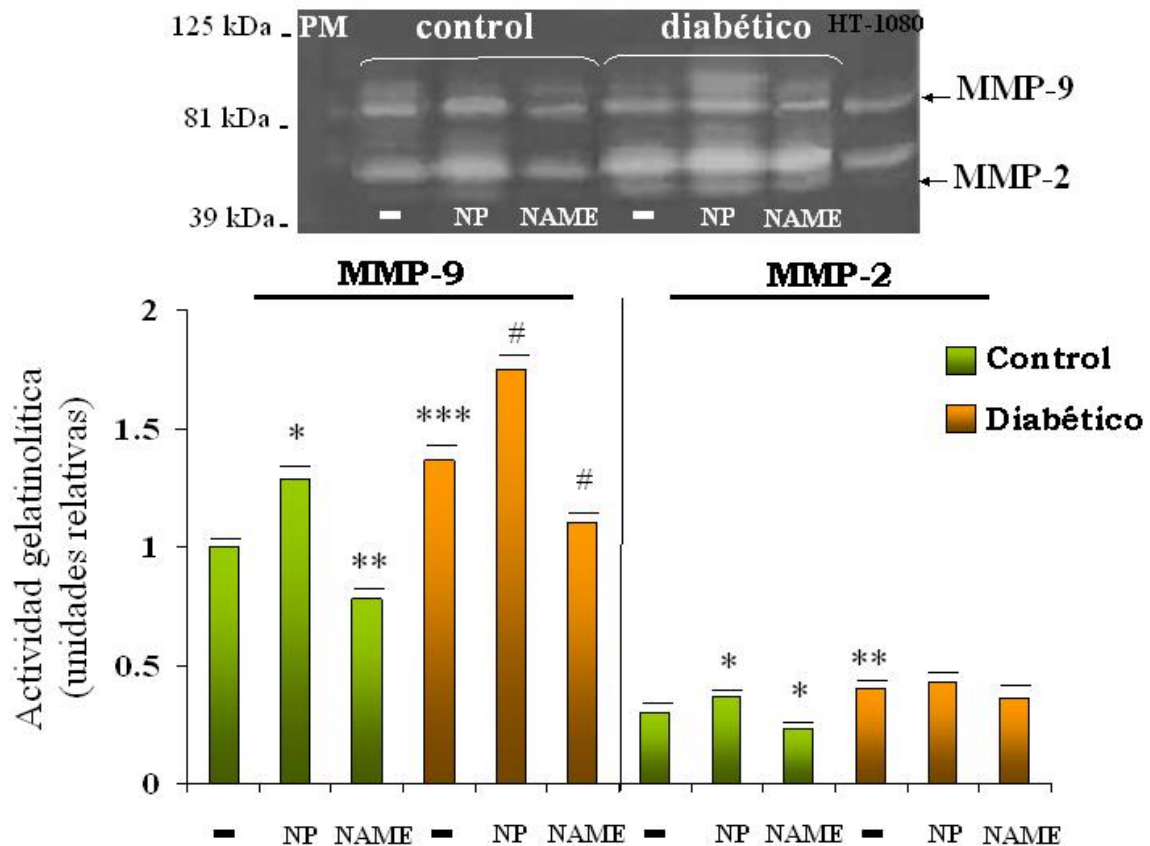
Los resultados mostrados previamente, revelan que las placentas y los fetos de los animales diabéticos están sometidos a estrés nitrosativo, representado por altos niveles de NO y la presencia de residuos de nitrotirosina. Para investigar si el óxido nítrico posee la capacidad de modular la activación post-transcripcional de las MMPs, los diferentes componentes de la unidad feto-placentaria fueron incubados en presencia de nitroprusiato de sodio, un potente dador de NO, o en presencia de L-NAME, inhibidor de la actividad de la enzima oxido nítrico sintasa.

La evaluación de la actividad gelatinolítica en la placa placentaria materna de los animales control mostró un incremento en la actividad de las proteasas MMP-2 y MMP-9 (p<0.05) en presencia de nitroprusiato de sodio 600 µM; este mismo efecto fue encontrado en la placa placentaria materna de los animales diabéticos pero sólo para MMP-9 (p<0.05), dado que la actividad de MMP-2 no resultó modificada por la presencia de este dador de NO. La adición al medio de incubación de NAME 600 µM provocó una disminución en la actividad gelatinolítica de MMP-2 (p<0.01) y MMP-9 (p<0.05) en la placa placentaria materna de los animales control en relación con el tejido

incubado sin adiciones. En la misma placa placentaria, el bloqueo de la producción endógena de NO causó la disminución de la actividad de MMP-9 ( $p < 0.05$ ) pero no afectó la actividad de MMP-2 en relación con los tejidos diabéticos incubados sin adiciones (Figura 26).

En la placa placentaria fetal, la adición de nitroprusiato de sodio al medio de incubación no produjo cambios en la actividad de MMP-9 ni en el tejido control ni en el tejido diabético evaluado. Sin embargo, el agregado de NAME produjo una marcada disminución en la actividad de MMP-9 ( $p < 0.05$ ) tanto en la placa placentaria fetal del grupo control como en los animales diabéticos. La actividad de MMP-2, ausente en la placa placentaria fetal de los animales control, no mostró modificaciones frente a la adición de nitroprusiato o de NAME en la placa placentaria fetal de los animales diabéticos (Figura 27).

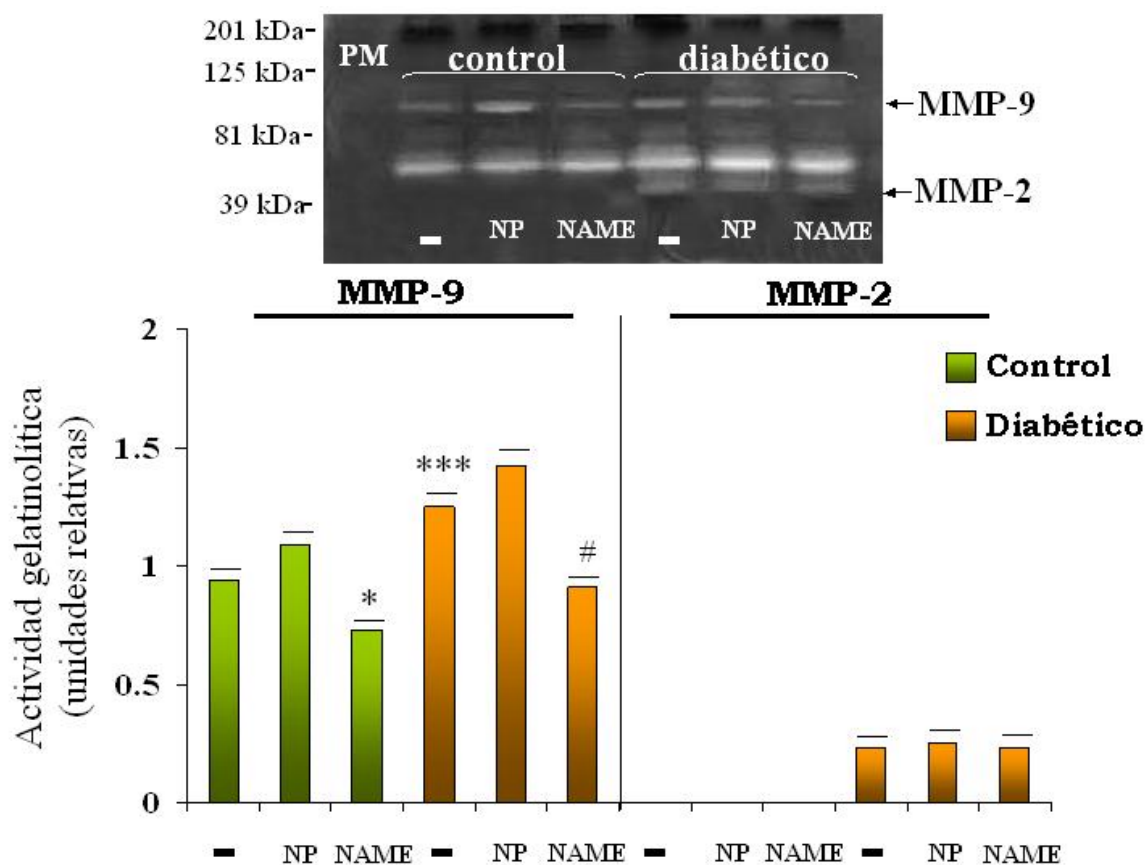
El mismo estudio realizado en fetos provenientes de ratas control mostró que la actividad de MMP-2 pudo ser regulada positivamente por la adición de nitroprusiato ( $p < 0.01$ ) y la presencia de NAME produjo una disminución en la actividad de esta proteasa ( $p < 0.01$ ) en relación con el control sin adiciones. Los mismos resultados fueron hallados en los fetos de animales diabéticos, donde el aumento de NO en el medio de incubación fue capaz de incrementar de manera significativa la actividad colagenolítica de MMP-2 ( $p < 0.05$ ), y el inhibidor de NOS produjo una disminución en la actividad de esta proteasa ( $p < 0.01$ ) en comparación con los fetos de ratas diabéticas incubados sin adiciones (Figura 28).



**Figura 26:** Efecto del óxido nítrico sobre la actividad de MMP-2 y MMP-9 en la placa placentaria materna de animales control y diabéticos.

El zimograma muestra la actividad gelatinolítica resultante en la placa placentaria materna de animales control y diabéticos luego de 1 h de incubación i) sin adiciones (-), ii) con nitroprusiato de sodio (NP) 600  $\mu$ M, generador de NO, iii) con L-arginina metil ester (Name) 600  $\mu$ M, inhibidor de la producción endógena de NO.

El gráfico muestra el análisis densitométrico de la actividad de MMP-2 y MMP-9 en la placa placentaria materna de ratas control y diabéticas i) sin adiciones (-); ii) con NP (600  $\mu$ M); iii) con NAME (600  $\mu$ M). Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=8). \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.005 v control sin adición, #p<0.05 v diabético sin adición. Test estadístico: ANOVA.

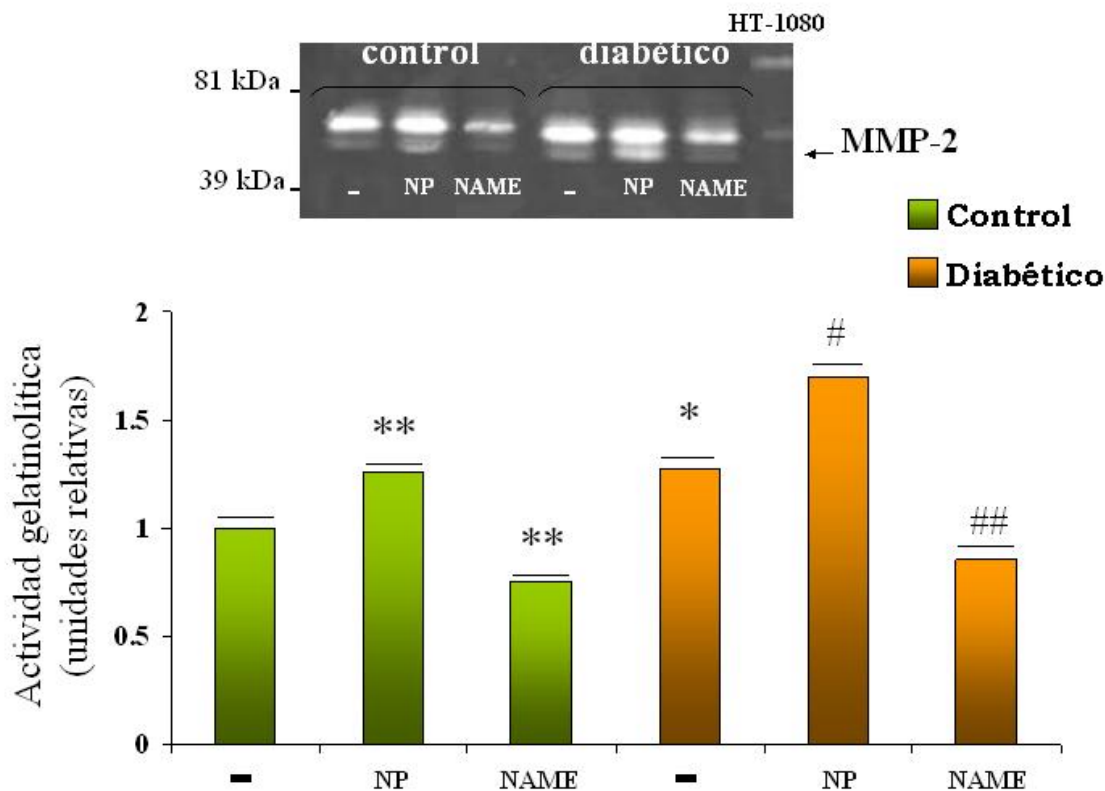


**Figura 27:** Efecto del óxido nítrico sobre la actividad de MMP-2 y MMP-9 en la placa placentaria fetal de animales control y diabéticos.

El zimograma muestra la actividad gelatinolítica de la placa placentaria fetal de ratas control y diabéticas luego de 1 h de incubación i) sin adiciones (-), ii) con NP 600  $\mu$ M, iii) con Name 600  $\mu$ M. Nótese que la actividad de MMP-2 permanece invariable frente a los diferentes tratamientos.

El gráfico muestra el análisis densitométrico de la actividad de MMP-2 y MMP-9 en la placa placentaria fetal de ratas control y diabéticas i) sin adiciones, representado en la figura como (-); ii) con NP (600  $\mu$ M); iii) con NAME (600  $\mu$ M). Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=8). \* $p$ <0.05 y \*\*\* $p$ <0.005  $\nu$  control sin adición, # $p$ <0.05  $\nu$  diabético sin adición. Test estadístico: ANOVA.





**Figura 28:** Efecto del óxido nítrico sobre la actividad de MMP-2 en feto de rata control y diabética.

Zimograma representativo de la actividad MMP-2 en fetos procedentes de madres control o diabéticas, luego de 1 h de incubación i) sin adiciones (-), ii) con NP 600  $\mu$ M, iii) con Name 600  $\mu$ M.

El gráfico muestra el análisis densitométrico de la actividad de MMP-2 en los fetos procedentes ratas control y diabéticas i) sin adiciones (-); ii) con NP (600  $\mu$ M); iii) con NAME (600  $\mu$ M). Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=8). \* $p$ <0.05 y \*\* $p$ <0.01  $\nu$  control sin adición, # $p$ <0.05 y ## $p$ <0.01  $\nu$  diabético sin adiciones. Test estadístico: ANOVA.

---

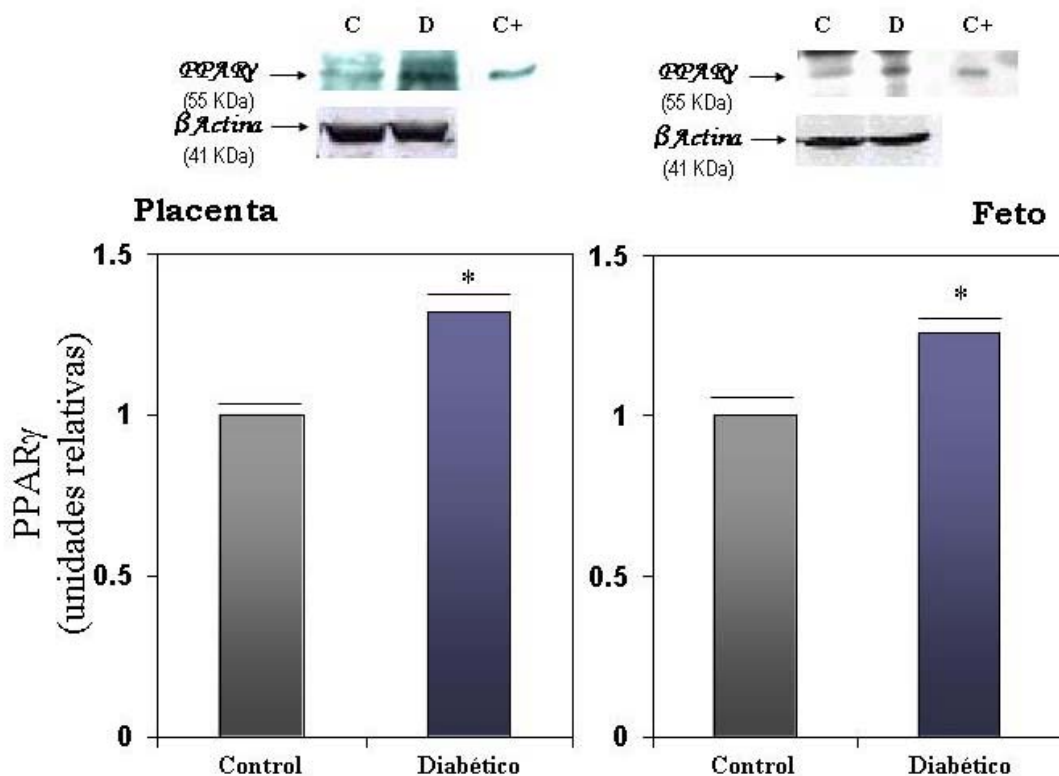
Capítulo IV
-------------

∞ REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LAS  
METALOPROTEINASAS POR 15D-PGJ<sub>2</sub> EN  
LA UNIDAD FETO-PLACENTARIA

**Niveles del receptor activado por factores de proliferación peroxisomal  
gamma (PPAR $\gamma$ )**

Es conocida la importancia de PPAR $\gamma$  en el desarrollo de la placenta (Barak y col., 1999). Un incremento en sus niveles en el día 13 de preñez sugiere que no sólo está implicado en la diferenciación de los trofoblastos sino además en la maduración de estas células y el establecimiento de la función de transferencia materno-fetal. (Asami-Miyagishi y col., 2004).

En este estudio realizamos la evaluación de la expresión de PPAR $\gamma$  en la unidad feto-placentaria de ratas control y diabéticas. Los resultados mostraron un incremento de este receptor en las placentas y en los fetos procedentes de ratas diabéticas en comparación con sus respectivos controles ( $p < 0.05$ ) (Figura 29).

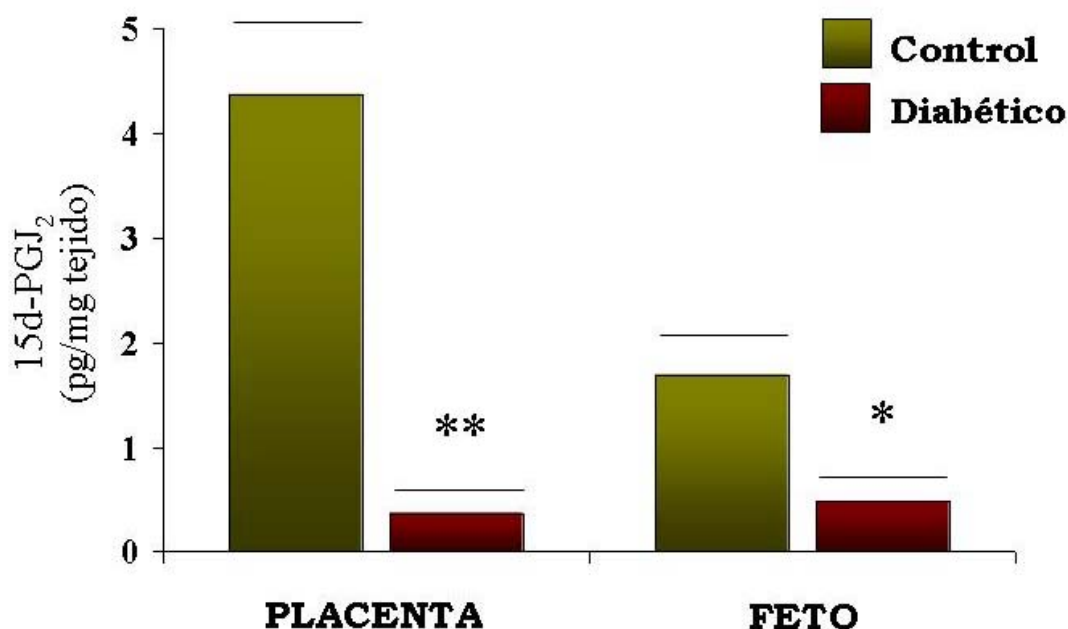


**Figura 29:** Niveles de PPAR $\gamma$  en la unidad feto-placentaria de ratas control y diabéticas. Los inmunoblots superiores son representativos de los niveles de PPAR $\gamma$  en placentas controles (C) y placentas diabéticas (D); fetos procedentes de ratas control (C) y fetos procedentes de ratas diabéticas (D). Lisado de células pulmonares fue empleado como control positivo (C+). Los inmunoblots inferiores muestran el control de  $\beta$ -actina. El gráfico indica el análisis densitométrico de los niveles de PPAR $\gamma$ , en la placenta y fetos de ratas control y de ratas diabéticas. Los datos están corregidos por el valor  $\beta$ -actina correspondiente a cada calle y representan la media  $\pm$  SEM, (n=4). \*p<0.05 v sus respectivos controles. Test estadístico: t-Student.

### Evaluación de los niveles de 15d-PGJ<sub>2</sub>

Dado a 15d-PGJ<sub>2</sub> es el ligando endógeno de mayor afinidad para PPAR $\gamma$  (Straus y col., 2000), y que este receptor presentó alteraciones en la unidad feto-placentaria de los animales diabéticos. Fue de interés determinar si la hiperglucemia materna es asimismo capaz de generar modificaciones en los niveles de dicho prostanoide en los tejidos placentarios y fetales estudiados.

Los niveles de 15d-PGJ<sub>2</sub> se encontraron fuertemente disminuidos en las placentas ( $p < 0.01$ ) y los fetos ( $p < 0.05$ ) procedentes de ratas diabéticas en comparación con los niveles de esta prostaglandina en sus respectivos controles (Figura 30).



**Figura 30:** Niveles de 15d-PGJ<sub>2</sub>, ligando endógeno de PPAR $\gamma$ , en placenta y fetos de ratas control y diabéticas. Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=7). \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  v sus respectivos controles. Test estadístico: t-Student (se realizó la comparación de los pares: placenta de rata control y placenta de rata diabética; fetos procedentes de ratas control y fetos procedentes de ratas diabéticas).

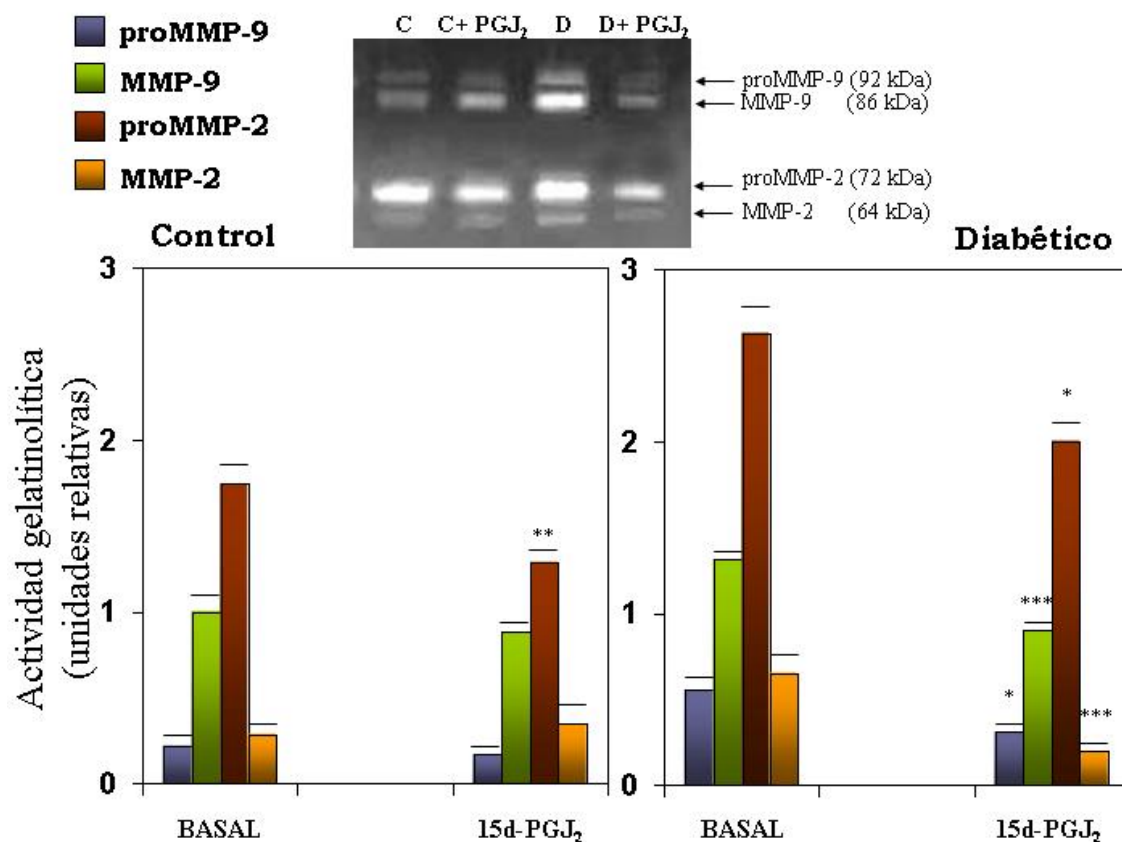
### **Regulación de MMP-2 y MMP-9 por 15d-PGJ<sub>2</sub> en la unidad feto-placentaria de ratas control y diabéticas**

Considerando que 15d-PGJ<sub>2</sub> ha sido descrita como un importante regulador negativo de la actividad MMPs en mocitos y macrófagos (Marx y col., 1998; Ricote y col., 1998; Shu y col., 2000), y en base a las presentes anomalías descritas en sus niveles en la unidad feto-placentaria de animales diabéticos, resultó de interés evaluar la acción de

esta prostaglandina sobre la actividad de MMP-2 y MMP-9 en la placenta y fetos a mediados de la gestación.

Para realizar este estudio se adicionó 15d-PGJ<sub>2</sub> ( $2 \times 10^{-6}$  M) al medio de incubación de placentas de animales sanos y diabéticos. El posterior análisis de la actividad metaloproteásica por medio de la técnica de zimografía mostró que en las placentas control la adición de 15d-PGJ<sub>2</sub> sólo fue capaz de modificar la actividad de proMMP-2 ( $p < 0.01$ ), no alterando la actividad del resto de las MMPs evaluadas (MMP-2, MMP-9 y proMMP-9). De manera contraria la adición de esta prostaglandina al medio de incubación del tejido diabético produjo una marcada disminución en la actividad de MMP-2 ( $p < 0.005$ ) y de MMP-9 ( $p < 0.005$ ), como así también de sus proenzimas, proMMP-2 ( $p < 0.05$ ) y proMMP-9 ( $p < 0.05$ ) (Figura 31).

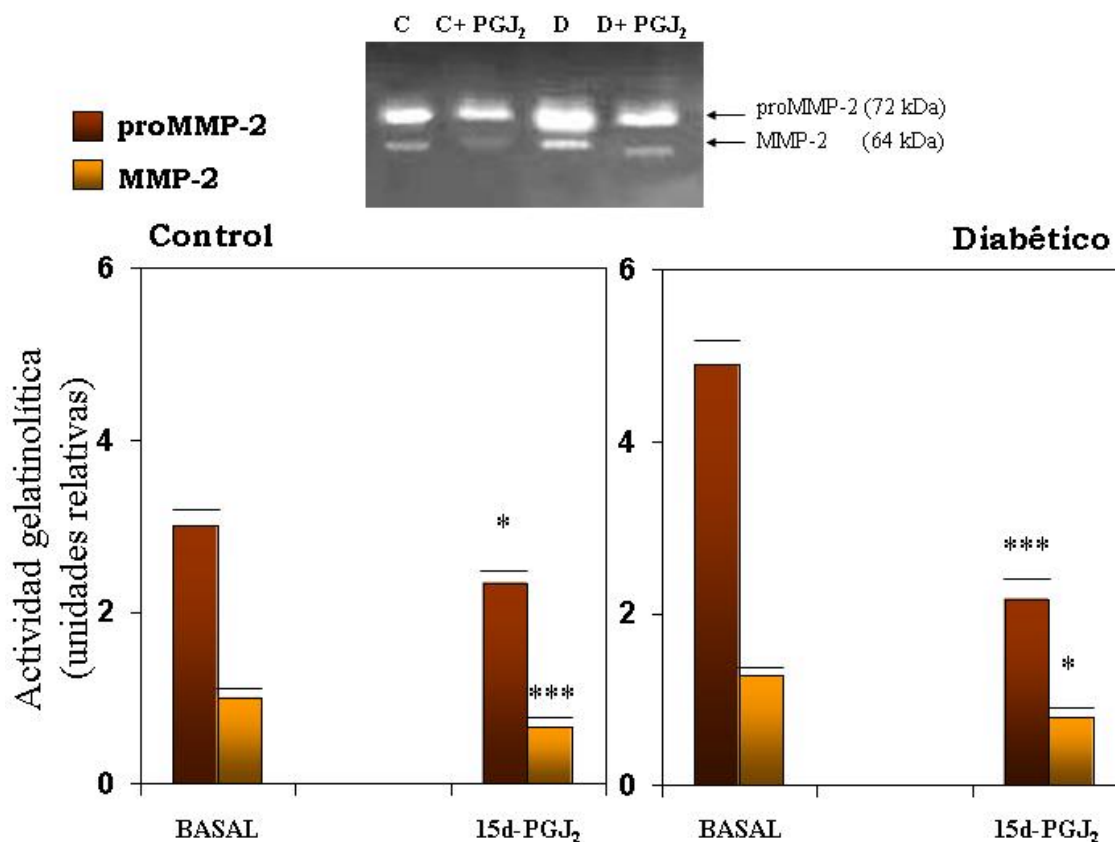
El mismo estudio fue realizado para evaluar la respuesta de las MMPs fetales a la adición de 15d-PGJ<sub>2</sub>. La presencia de esta prostaglandina en el medio de incubación de los fetos procedentes de ratas control, causó una importante reducción tanto de la actividad de MMP-2 ( $p < 0.005$ ) como de su proenzima ( $p < 0.05$ ). Resultados similares fueron obtenidos en los fetos procedentes de ratas diabéticas, en los cuales MMP-2 ( $p < 0.05$ ) y pro-MMP-2 ( $p < 0.005$ ) presentaron menor actividad en comparación con sus controles sin adición (Figura 32).



**Figura 31:** Efecto de 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la actividad de MMP-2, MMP-9 y sus respectivas proenzimas.

El zimograma muestra la actividad gelatinolítica en la placenta de ratas control y diabéticas luego de 1 h de incubación i) sin adiciones, ii) con 15d-PGJ<sub>2</sub> ( $2 \times 10^{-6}$  M).

El gráfico muestra el análisis densitométrico de la actividad de MMP-2, MMP-9 y de sus respectivas proenzimas en la placenta de ratas control y diabéticas i) sin adiciones (BASAL); ii) con 15d-PGJ<sub>2</sub> ( $2 \times 10^{-6}$  M). Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=7). \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.005 v sus respectivos controles sin adición. Test estadístico: ANOVA.



**Figura 32:** Efecto de 15d-PGJ<sub>2</sub> sobre la actividad de MMP-2 y proMMP-2 en los fetos procedentes de ratas control y diabéticas.

El zimograma muestra la actividad gelatinolítica en los fetos procedentes de ratas control y diabéticas luego de 1 h de incubación i) sin adiciones, ii) con 15d-PGJ<sub>2</sub> ( $2 \times 10^{-6}$  M).

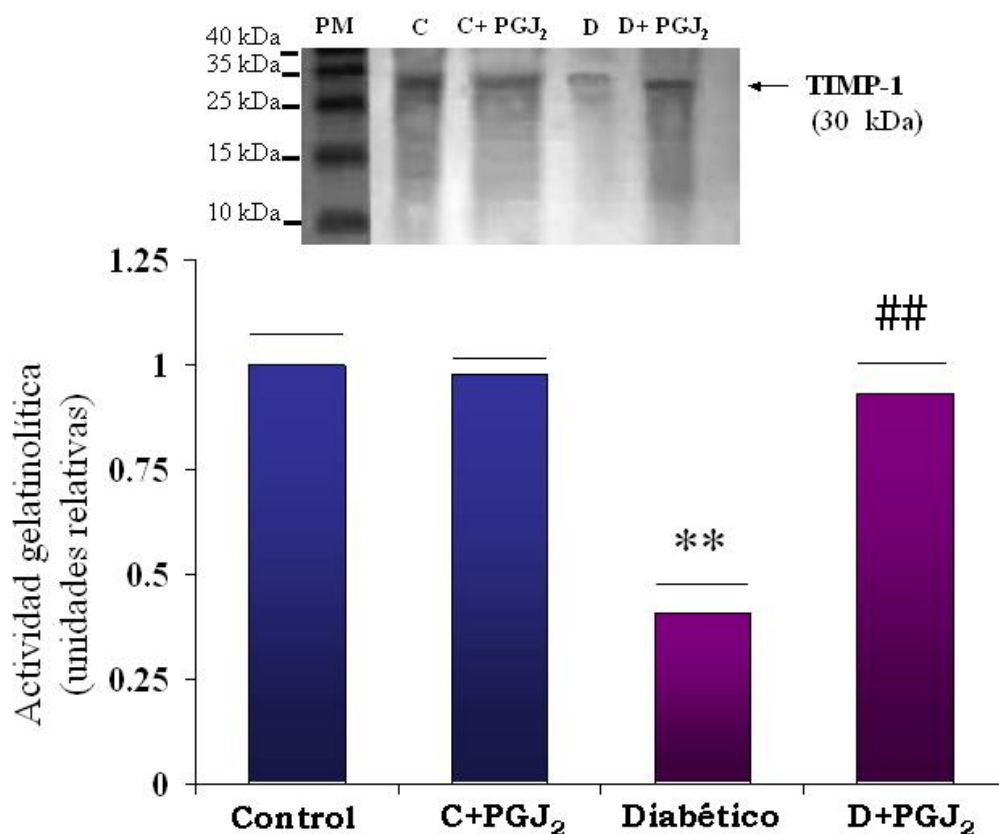
El gráfico muestra el análisis densitométrico de la actividad de MMP-2 y proMMP-2 de los fetos de ratas control y diabéticas i) sin adiciones (BASAL); ii) con 15d-PGJ<sub>2</sub> ( $2 \times 10^{-6}$  M). Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=7). \*p<0.05, \*\*p<0.01 y \*\*\*p<0.005 v sus respectivos controles sin adición. Test estadístico: ANOVA.

### **Expresión de los TIMPs y su regulación por 15d-PGJ<sub>2</sub> en la unidad feto-placentaria de ratas control y diabéticas**

La técnica de zimografía reversa fue empleada para estudiar la presencia de los TIMPs en la unidad feto-placentaria diabética. El análisis de los tejidos reveló la presencia de TIMP-1 en la placenta de ratas control y diabéticas, no siendo posible la detección de ninguno de los inhibidores específicos en los fetos procedentes de los animales evaluados.

El análisis densitométrico mostró que la expresión de TIMP-1 se encuentra disminuida en el tejido placentario de animales diabéticos en relación al control ( $p < 0.01$ ).

La adición al medio de incubación de 15d-PGJ<sub>2</sub> ( $2 \cdot 10^{-6}$  M) no modificó los niveles de TIMP-1 en las placentas de rata sana, pero provocó un importante incremento del mismo en las placentas de ratas diabéticas ( $p < 0.01$ ), acercándolo a valores comparables a los del grupo control.



**Figura 33:** Regulación de los niveles de TIMP-1 por acción de 15d-PGJ<sub>2</sub>, en la placenta de ratas control y diabéticas.

El zimograma reverso muestra los niveles de TIMP-3 en la placenta de ratas control y diabéticas, luego de 1 h de incubación i) sin adiciones, ii) con 15d-PGJ<sub>2</sub> ( $2 \cdot 10^{-6}$  M).

El gráfico muestra el análisis densitométrico de los niveles de TIMP-3 en las placentas de ratas control y diabéticas i) sin adiciones; ii) con 15d-PGJ<sub>2</sub> ( $2 \cdot 10^{-6}$  M). Los datos representan la media  $\pm$  SEM, (n=5). \*\* $p < 0.01$  v control; ## v diabético sin adición. Test estadístico: ANOVA.



## ∞ Discusión ∞

La influencia de la diabetes en la preñez ha sido asociada con la aparición de alteraciones placentarias, malformaciones congénitas y otras alteraciones en el desarrollo del feto (Mills, 1982; Desoye y Shafir, 1996). A pesar de un estricto control metabólico a través de la dieta o de la administración de insulina durante la gestación, estas anomalías son persistentes, y las malformaciones congénitas siguen siendo la mayor causa de morbilidad y mortalidad de los hijos de madres diabéticas (Reece y Hobbins, 1986; Barahona y col., 2005).

¿Cuáles son los mecanismos por los que la diabetes materna puede alterar el desarrollo embrionario y placentario? Este aspecto aun encierra muchos interrogantes.

A pesar de los numerosos estudios realizados, no se han dilucidado enteramente los factores involucrados en los daños inducidos por la diabetes materna en los órganos reproductivos, debido al nivel de complejidad de los mecanismos que se hallan implicados en dichos procesos.

*En este estudio se realizó el análisis de la expresión y actividad de las MMP-2 y MMP-9 en la unidad feto-placentaria y de la acción de diversos factores moduladores que se encuentran alterados en esta patología, para lo cual se empleó un modelo de diabetes moderada, en el que la hiperglucemia materna es similar a los valores que presentan las mujeres gestantes aun bajo estricto control metabólico.*

---

### **La expresión y actividad de MMP-2 y MMP-9 se encuentran alteradas en la unidad feto-placentaria diabética**

La invasión del trofoblasto en el endometrio materno, la posterior diferenciación de las células trofoblásticas para originar todos los linajes celulares que compondrán el órgano placentario y el establecimiento de una correcta adaptación vascular son algunos de los pasos que deberán producirse de manera ordenada para culminar con la formación exitosa de la placenta.

La unión del blastocisto al epitelio luminal uterino y la consecuente degradación de la membrana basal e invasión de las células trofoblásticas en el estroma del órgano ocurre a través de una reestructuración controlada de la matriz extracelular (MEC). Este cambio en la MEC es llevado a cabo por la acción de MMPs secretadas tanto por el blastocisto como por la propia decidua materna (Salamonsen, 1999).

Estudios desarrollados en roedores en los días peri-implantatorios han podido determinar que la expresión y actividad de MMP-2 se encuentran incrementadas en la células deciduales (Das y col., 1997; Novaro y col., 2002), mientras que la expresión de MMP-9 se encuentra mayoritariamente localizada en las células del trofoblasto (Whiteside y col., 2001; Alexander y col., 1996; Das y col., 1997). Esto sugiere una acción diferencial de las MMPs secretadas por el embrión y la decidua. Así mientras que MMP-9 se encontraría participando en la invasión del blastocisto en el estroma uterino, MMP-2 estaría involucrada en la decidualización y neovascularización requeridas para la formación de la placenta. Esto evidencia muy tempranamente las diferencias en la expresión y acción de estas MMPs en los dos futuros tejidos componentes del órgano placentario.

*En el presente trabajo hemos analizado la localización y la actividad de MMP-2 y MMP-9 en el tejido placentario de ratas control y diabéticas a mediados de la gestación.*

Los estudios realizados en esta tesis fueron hechos a los 13.5 días de preñez, un día posterior a la adquisición de funcionalidad por parte del órgano placentario, caracterizada por el establecimiento del transporte materno-fetal. En forma adicional, el estudio de la actividad proteásica en este período de la gestación posibilita distinguir claramente las diferencias existentes entre las dos placas componentes de la placenta debido a que aun no se ha producido la invasión de la decidua por parte de las células glucogénicas del espongiotrofoblasto (Teesalu y col., 1999). De este modo, la separación del órgano placentario en tejidos de origen materno (placa placentaria materna o decidua) y en tejidos de origen fetal (placa placentaria fetal compuesta por: la zona de unión y el laberinto) permite evaluar de manera diferencial las características de ambos componentes.

Coincidiendo con lo relatado anteriormente, nuestros resultados muestran una intensa expresión de MMP-2 detectada mayoritariamente en las células gigantes del trofoblasto presentes en la interfase placentaria materno-fetal, mientras que la expresión de MMP-9, detectada en ambas placas placentarias tanto en su forma activa como latente, fue localizada en las células gigantes del trofoblasto de la zona de unión y en las células del laberinto placentario. Esta distribución espacial selectiva permitiría inferir que a mediados de la gestación MMP-2 continuaría constitutivamente vinculada con la zona materna de la placenta, mientras que la actividad de MMP-9 se correlacionaría en gran parte con la invasividad trofoblástica. Si bien la expresión de su zimógeno fue detectada en ambas placas placentarias, MMP-2 presentó actividad solamente en la placa placentaria materna. La existencia de proMMP-2 en la placa placentaria fetal en ausencia de su forma activa se relacionaría con la formación de un pool de enzima que puede ser rápidamente reclutada bajo determinadas condiciones, tanto fisiológicas como patológicas.

La inmunolocalización de MMP-2 y MMP-9 no reveló la presencia de estas proteasas en la placa placentaria materna, a pesar de que la actividad de las mismas fue detectada por

los zimogramas. Esta aparente contradicción ya fue reportada previamente en los trabajos de Alexander y Teeselu (Alexander y col., 1996; Teeselu y col., 1999). Se podría inferir que la fuerte expresión de MMP-2 y MMP-9 en las células gigantes del trofoblasto (en relación directa con la placa placentaria materna) se debe a la capacidad de estas células de secretar las MMPs de manera polarizada, pudiéndolo hacer de manera preferencial hacia el estroma de la decidua (Sawicki y col., 2000). De este modo, la actividad metaloproteinásica encontrada en la porción materna de la placenta sería consecuencia de la activación de las proMMPs secretadas por las CTG hacia la MEC de la decidua.

Asimismo, la localización y actividades diferenciales de las MMPs en los tejidos componentes de la placenta, y la co-expresión de MMP-2 y MMP-9 en las CTG de la interfase feto-materna, sugieren un rol importante de estas MMPs en la formación y reestructuración de la placenta discoidal, proceso llevado a cabo en el período de la gestación que estamos evaluando (Abrahamsohn y Zorn, 1993).

Estudios previos realizados por nuestro grupo, revelaron que la actividad de MMPs se encuentra incrementada en el tejido uterino de las ratas diabéticas en el momento de la implantación (Pustovrh y col., 2002) y en placenta a término de mujeres diabéticas pregestacionales (Pustovrh y col., 2000). En correspondencia con estos resultados, la evaluación de las MMPs en el tejido placentario de ratas diabéticas, mostró un incremento en la expresión de MMP-2 y MMP-9 tanto en la zona del laberinto, como en la zona de unión. Asimismo, los niveles de proMMP-2 y proMMP-9 así como la actividad enzimática de MMP-2 y MMP-9 resultaron mayores en ambas placas placentarias (materna y fetal) en comparación con la placenta de ratas sanas. Es interesante destacar que a pesar de que la actividad MMP-2 fue indetectable en la placa placentaria fetal del grupo control, su actividad sí se manifestó en esta placa placentaria de los animales diabéticos. **Esta diferencia refleja claramente una alteración en la**

---

**regulación postranscripcional de las MMPs en la placenta de los animales diabéticos.**

Durante el desarrollo placentario las MMPs juegan un rol importante en la remodelación continua de la MEC para llevar a cabo los procesos de angiogénesis, maduración de las vellosidades y crecimiento del órgano (Vagnoni y col., 1998; Solberg y col., 2003). Estudios realizados en placenta de oveja, mostraron que MMP-2 y MMP-9 están implicadas en la reestructuración de la MEC y en la apoptosis de los trofoblastos que se encuentran en las interdigitaciones de las vellosidades, aumentando el patrón de ramificación de las mismas, lo cual conduce al incremento en el área de superficie de intercambio materno fetal (Riley, 2000). Por otro lado, una elevada actividad de MMPs en tejidos diabéticos ha sido correlacionada con el desarrollo de complicaciones como el pie diabético y la retinopatía (Wall y col., 2003; Noda y col., 2003). Al inicio de la placentación, bajos niveles de MMPs están relacionados con la pobre invasión del trofoblasto en la decidua materna y el desencadenamiento de la preeclampsia (Galewska y col., 2003), mientras que ha sido descrito un incremento en la actividad de estas proteasas en las enfermedades trofoblásticas caracterizadas por una excesiva invasión y proliferación del trofoblasto (Okamoto y col., 2002). En dicho período, la actividad de MMPs se relacionaría con los procesos de vasculogénesis y modificación de las arterias espirales llevados a cabo durante el establecimiento temprano del órgano placentario (Blankenship y Enders, 1997; Solberg y col., 2003).

En etapas posteriores de la gestación, la patología diabética causa alteraciones en el desarrollo de la vasculatura placentaria, inmadurez vellositaria, bajo grado de madurez y diferenciación trofoblástica, así como también engrosamiento de la superficie vellositaria de intercambio materno-fetal (Desoye y Shafir, 1996). **En este sentido el incremento de MMPs en las placentas que provienen de ratas diabéticas podría vincularse de manera directa con un aumento en el índice de proliferación celular y de neoangiogénesis, conduciendo a un elevado número de vellosidades inmaduras y**

**a una mayor vascularización, alteraciones estructurales observadas en el modelo de diabetes estudiado.** *De esta forma, estos estudios sientan las bases para una futura profundización de la implicancia de las MMPs en la etiología de estas anomalías estructurales placentarias inducidas por la diabetes.*

Las MMPs están involucradas en el desarrollo embrionario y fetal, y participan en la remodelación necesaria para la formación de los tejidos nervioso, cardíaco y óseo (Ratajiska y Celutjens, 2002; Holmbeck y col., 2003).

Si bien los tejidos fetales expresan tanto MMP-2 como MMP-9 en el día 13.5 de gestación, sólo la actividad de MMP-2 fue detectada por zimografía, indicando que la acción de esta proteasa es relevante en este período gestacional. Estos resultados concuerdan con otros estudios sobre morfogénesis de diversas estructuras, realizados en esta etapa.

Chin y Werb, demostraron que el desarrollo del arco mandibular está mayoritariamente regulado por MMP-2 y que la expresión de MMP-9 en este proceso se limita a los osteoclastos del hueso mandibular en formación (Chin JR y Werb Z; 1997). Así también, los estudios realizados sobre el desarrollo pulmonar y la formación de los islotes pancreáticos apuntan a MMP-2 como la principal reguladora de los procesos de reestructuración tisular que ocurren en este período (Miralles y col., 1998; Kheradmand y col., 2002).

En el presente estudio, los animales diabéticos mostraron mayor expresión de MMP-2 y MMP-9, conjuntamente con un incremento en los niveles de proMMP-2 y MMP-2 activa en comparación con los fetos procedentes de ratas control. **Este marcado aumento en la actividad de MMP-2 puede estar involucrado en la formación anómala de los órganos fetales en desarrollo.**

Aun muy poco es conocido sobre el efecto de la sobreexpresión de las MMPs en el desarrollo fetal, pero es claro que la expresión aberrante de las mismas lleva a la formación alterada de los órganos fetales. Se sabe que la deficiencia de MMP-2 produce

alteraciones en la ramificación de los bronquios y una pobre alveolización pulmonar (Kheradmand y col., 2002), mientras que la inhibición de la actividad de esta proteasa en el páncreas o en el riñón en formación altera el normal desarrollo de estos órganos (Miralles y col., 1998). Esto denota la importancia de la correcta expresión y actividad de esta MMP en la formación de los órganos fetales.

**La diabetes provoca alteraciones en el desarrollo embrionario, las cuales se presentan mayoritariamente en la formación del sistema nervioso, la migración de las células de la cresta neural y el desarrollo cardíaco (Simán y col., 2000; Eriksson y col., 2003), todos procesos en los cuales el incremento en la actividad de la MMP-2 puede jugar un importante rol en la disrupción de la migración y diferenciación celular conjuntamente con alteraciones en la reorganización de la MEC. Es por estos antecedentes, que el hallazgo de la producción anómala de MMP-2 durante el desarrollo fetal, podría constituir la base de un novedoso acercamiento al origen de la dismorfogénesis embrionaria inducida por la diabetes.**

*Dadas las anomalías en la actividad metaloproteásica en la unidad feto-placentaria y sus posibles implicancias en el desarrollo del feto y de la placenta, se profundizó en los mecanismos regulatorios de la actividad de estas enzimas.*

### **Las especies reactivas del oxígeno incrementan la actividad de MMP-2 y MMP-9 en la unidad feto-placentaria de ratas diabéticas**

El estrés oxidativo es un desbalance entre la producción de especies reactivas del oxígeno y las defensas antioxidantes, y puede causar severos daños en los tejidos en los cuales se produce (Halliwell y col., 1997). En las mujeres gestantes sanas existe un aumento de las especies reactivas del oxígeno comparado con las no gestantes, pero este incremento va acompañado por el de las enzimas antioxidantes (Takehara y col., 1990; Walsh, 1998).

En el presente estudio investigamos la capacidad de ROS para regular la actividad de las MMPs en la unidad feto-placentaria de ratas diabéticas a mediados de la gestación.

El aumento de las especies reactivas del oxígeno y la presencia de daño tisular producida por las mismas ya han sido descritos en la placenta a término de pacientes y animales diabéticos (Pustovrh y col., 2000; White y col., 2002; Coughlan y col., 2004; Myatt y Cui, 2004). En estos tejidos la actividad de las enzimas antioxidantes se mostraron incrementadas (Lyll y col., 1998; Coughlan y col., 2004) o disminuidas (Pustovrh y col., 2000; White y col., 2002; Kinalski y col., 1999), según la capacidad compensatoria del tejido en estudio, pero en ambos casos han señalado la presencia de mayores índices de estrés oxidativo que en los tejidos control.

En el presente estudio, los niveles de lipoperóxidos fueron elevados en la placenta y fetos procedentes de ratas diabéticas, siendo más altos en la placa materna placentaria que en la placa placentaria fetal de estos animales. La generación de ROS compromete profundamente la respuesta vascular placentaria (Kossenjans y col., 2000), impidiendo que este órgano pueda adecuarse correctamente a una mayor demanda sanguínea requerida para el crecimiento fetal, poniendo en riesgo el desarrollo de la progenie.

La evaluación de las enzimas antioxidantes mostró que en la porción materna de la placenta existe una marcada disminución de la actividad de las enzimas SOD y catalasa, mientras que la placa fetal placentaria respondió al incremento de estrés oxidativo materno con un aumento en la actividad de catalasa, y mostró una actividad de SOD similar al control. **Estos resultados sugieren que el órgano placentario puede amortiguar la influencia del estrés oxidativo materno con cierta eficiencia, produciendo una disminución del impacto oxidativo desde la placamaterna hacia el feto.**

Las especies reactivas del oxígeno han sido previamente descritas como reguladores positivos de la actividad de las MMPs en diferentes tejidos, incluida la placenta humana (Buhimschi y col., 2000; Pustovrh y col., 2000; Nelson y Melendez, 2004). En el presente estudio observamos que los oxidantes y antioxidantes pueden regular la



actividad de las MMPs en la placa placentaria materna sin afectar la actividad de las mismas en la placa placentaria fetal; **sugiriendo que el tejido placentario de origen fetal es más resistente al estrés oxidativo que el de origen materno.**

Estudios comparativos realizados previamente indican que los embriones de ratas diabéticas parecen mostrar menor impacto del estrés oxidativo que sus madres (Viana y col., 2000). En el presente trabajo nosotros hemos encontrado una disminución gradual de lipoperóxidos desde la placa placentaria materna hacia el feto, corroborando que la placenta juega un rol importante como barrera de protección fetal, frente al estrés oxidativo inducido por la diabetes materna.

Las especies oxidantes son responsables de gran parte de los daños que la hiperglucemia materna induce en los embriones (Eriksson y col., 2003). Efectivamente, los lipoperóxidos y otras especies secundarias generadas por ROS son capaces de inducir severos daños celulares, como la carbonilación de las proteínas, daño oxidativo de ADN e incremento en la tasa de apoptosis, anomalías que han sido encontradas previamente en embriones de ratas diabéticas (Fine y col., 1999; Viana y col., 2000; Cederberg y col., 2001), generando dismorfogénesis embrionaria y alteraciones en el desarrollo fetal. De acuerdo con estos resultados, una disminución en la tasa de malformaciones fue encontrada en respuesta a diferentes tratamientos con antioxidantes en modelos experimentales de diabetes (Sivan y col., 1996; Siman y Eriksson, 1997). Por otro lado, en el feto parece existir una relativa inmadurez en los mecanismos de eliminación de los radicales libres cuando lo comparamos con aquellos presentes en el neonato (El-Hage y Singh, 1990), lo cual los hace extremadamente sensibles a los agentes oxidantes. A pesar de esta deficiencia, nuestros resultados indican que los fetos provenientes de ratas diabéticas tienen la capacidad de elevar la actividad de las enzimas antioxidantes SOD y catalasa en respuesta al estrés oxidativo generado por la hiperglucemia materna. Otros estudios han mostrado un aumento o una disminución en la capacidad antioxidante de los tejidos embrionarios, otra vez dependiendo de la severidad de la diabetes materna y de la sensibilidad de la cepa animal en la cual estos estudios fueron realizados (Sivan y

col., 1997; Khan y Black, 2003; Weksler-Zangen y col., 2003). **A pesar de los evidentes mecanismos compensatorios desarrollados por la unidad feto-placentaria de estos animales diabéticos, el estrés oxidativo inducido por la diabetes materna parece estar directamente relacionado con el aumento de la actividad de la MMP-2 fetal, y, en consecuencia, posiblemente interfiera con el desarrollo fetal alterando la formación de estructuras que se encuentran en activa morfogénesis y se vinculan al desarrollo de un gran número de órganos en esta edad gestacional.**

### **El óxido nítrico es un modulador positivo de la actividad de MMP-2 y MMP-9 en la unidad feto-placentaria diabética**

El óxido nítrico cumple un rol fundamental en el proceso de angiogénesis (Shizukuda y col., 1999; Babaei y Stewart, 2002), el cual está activamente presente en la formación y maduración de la placenta así como también durante el desarrollo embrionario. Asimismo, el NO es un importante modulador del flujo sanguíneo, tanto en tejidos adultos como fetales (Bustamante y col., 1996; Noris y col., 1996; Baylis y col., 1998b). En la placenta humana juega un rol vital en el mantenimiento de una baja resistencia vascular (Myatt y col., 1991).

Sin embargo niveles alterados de este agente son nocivos para los tejidos. Una excesiva producción de NO está asociada con daño celular y tisular, neurotoxicidad, inflamación y vasodilatación masiva (Dawson y col., 1991; Gross y Wolin, 1995), mientras que bajos niveles de este agente causan alteraciones en la circulación placentaria, defectos en el desarrollo de los miembros durante la organogénesis embrionaria y aumento en el riesgo cardiovascular en la vida adulta (Tiboni y col., 2003; Chrapko y col., 2005).

En este estudio hemos evaluado los niveles de NO a través de sus metabolitos estables (nitros/nitritos) y de la actividad de la enzima NADPH-d. Ambos parámetros se muestran elevados en ambas placas placentarias y en los fetos de los animales diabéticos. **Estos resultados indican la existencia de un incremento en la producción de NO en la unidad feto placentaria diabética.**

El NO tiene la capacidad de reaccionar con el radical superóxido formando peroxinitritos, potentes agentes oxidantes. El radical peroxinitrito es citotóxico porque inhibe la cadena mitocondrial de transporte de electrones (Radi y col., 1994), oxida los grupos sulfhidrilos en las proteínas y es capaz de iniciar procesos de peroxidación lipídica sin la presencia de metales de transición (Radi y col., 1991). El daño a las proteínas es evidenciado principalmente por la nitración de aminoácidos como la tirosina, afectando las vías de transducción de señales (Ischiropoulos y col., 1992).

La acción del radical peroxinitrito sobre la unidad feto-placentaria de los animales diabéticos fue evaluada por medio de la identificación inmunohistoquímica de residuos de nitrotirosina. Las placentas y fetos de animales diabéticos presentaron un significativo índice de estrés nitrosativo en comparación a los tejidos reproductivos de ratas sanas. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos realizados por nuestro grupo que muestran un aumento de la presencia de residuos de nitrotirosina en las placentas a término de ratas con diabetes moderada y de embriones en período de organógenesis provenientes de ratas con diabetes severa (Capobianco y col., 2005; Jawerbaum y col., 2005b). Otros autores han detectado residuos de nitrotirosina en placentas humanas a término de pacientes pre-eclámpticas o con diferentes grados de diabetes, demostrando la relación entre este agente y la producción de daño en los vasos sanguíneos (Lyll y col., 1998; Noris y col., 2004).

**En base a estos resultados y a los previamente discutidos, es claro que la hiperglucemia materna lleva al incremento en los niveles de NO y ROS, y a la generación de peroxinitritos capaces de dañar la placenta y los tejidos fetales en desarrollo.**

De manera interesante hemos observado en el presente estudio, que el patrón espacial de NADPH-d y nitrotirosina es coincidente con el de la expresión de las MMPs en los tejidos diabéticos. Existen antecedentes de que el NO es capaz de incrementar la actividad de la MMPs en diversos tejidos. Efectivamente, el NO modula la actividad de

MMP-9 en las células del músculo liso vascular, células ganglionares de la retina (Marcet-Palacios y col., 2003; Manabe y col., 2005), tejido placentario y cultivo de trofoblastos humanos a término (Pustovrh y col, 2000; Novaro y col., 2001), mientras que la actividad de MMP-2 es incrementada por acción del NO en el tejido uterino de ratas sanas y diabéticas (Novaro y col., 2002; Pustovrh y col., 2002).

*En base a estos resultados fue de interés evaluar el rol del NO sobre la actividad de las MMPs placentarias y fetales.*

Al analizar la acción de NO sobre MMP-2 y MMP-9 encontramos que la actividad de dichas proteasas puede ser modulada positivamente por este agente en la placa materna de la placenta de las ratas control, y sólo la actividad de MMP-9 puede ser modificada por acción del NO en la misma placa placentaria de las ratas diabéticas. Simultáneamente hemos comprobado que la exposición *in vitro* a elevados niveles de NO no modifica la actividad de MMP-2 y MMP-9 en la placa placentaria fetal tanto de animales control como diabéticos, evidenciando una mayor resistencia a la acción activadora del compuesto sobre la actividad enzimática, cuando comparamos este tejido con la placa materna de la misma placenta.

En cambio la MMP-2 es sensiblemente afectada por NO en fetos de ratas control y diabéticas, señalando que estos tejidos muestran una menor capacidad para prevenir alteraciones originadas por el estrés nitrosativo.

En los embriones murinos la expresión de la eNOS y la iNOS ocurre muy tempranamente durante el desarrollo cardíaco, y luego decae en el día 14.5 de gestación. Esta disminución es más marcada para iNOS que para eNOS, produciéndose un mayor decaimiento de su expresión en el ventrículo en comparación con la aurícula (Bloch y col., 1999). **El fuerte incremento encontrado para NADPH-d y MMP-2 en el ventrículo de los fetos procedentes de ratas diabéticas puede ser una clave para explicar el alto índice de anormalidades en el desarrollo cardíaco inducido por el**

entorno diabético, que se refleja en altos índices de morbilidad y mortalidad perinatales y en cardiopatías en la vida adulta de la progeñe.

### **15d-PGJ<sub>2</sub> (ligando endógeno de PPAR $\gamma$ ) disminuye la expresión y actividad de MMP-2 y MMP-9 en la unidad feto-placentaria diabética**

Los receptores activados por factores de proliferación peroxisomal (PPARs) están involucrados en la homeostasis celular energética e inflamatoria. Si bien en un comienzo PPAR $\gamma$ , descrito inicialmente en tejido adiposo, fue localizado en el hígado, el corazón y el músculo esquelético (Mukherjee y col., 1997), actualmente su presencia ha sido detectada en muchos otros tejidos, entre los que se encuentra la placenta y los tejidos fetales en desarrollo (Huin y col., 2000; Wang y col, 2002; Berry y col., 2003).

PPAR $\gamma$  tiene un importante efecto anti-inflamatorio, y está implicado en la regulación negativa de la iNOS y de las citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) (Jiang y col., 1998; Ricote y col., 1998). Además, PPAR $\gamma$  modula la proliferación, diferenciación y muerte celular (Hashimoto y col, 2002; Liu y col., 2003; Pavan y col., 2003).

En el presente trabajo hemos evaluado los niveles de PPAR $\gamma$  encontrando que la expresión de este receptor está incrementada en las placentas y fetos de los animales diabéticos. Este resultado parece ser particular de esta etapa del desarrollo, ya que nuestro grupo de trabajo a reportado reducciones en los niveles de PPAR $\gamma$  en las placentas a término de pacientes y de ratas con diabetes moderada (Jawerbaum y col. 2004; Capobianco y col., 2005). Estos resultados no son llamativos, ya que la regulación de PPAR $\gamma$  es compleja y claramente dependiente de las etapas del desarrollo y de diversos factores que condicionan su expresión (Huin y col., 2000; Barlier Mur y col., 2003; Inui y col., 2003). El estudio de 15d-PGJ<sub>2</sub>, ligando endógeno de PPAR $\gamma$ , reveló la existencia de bajos niveles de esta prostaglandina en las placentas y en los fetos procedentes de madres diabéticas. Este efecto de la diabetes sobre los niveles de

15d-PGJ<sub>2</sub> ya había sido descrito previamente por nuestro grupo (Jawerbaum y col., 2004; Capobianco y col., 2005). Estos resultados sugieren que existiría una respuesta temprana por la cual se produce un incremento en los niveles del receptor tendiente a compensar la severa disminución de 15d-PGJ<sub>2</sub>, mecanismo que dejará de ser funcional en etapas posteriores del desarrollo.

Diversos estudios, realizados principalmente en macrófagos y monocitos, revelan que la activación de este receptor se encuentra involucrada en la disminución de la expresión de MMP-9 (Marx y col., 1998; Ricote y col., 1998; Shu y col., 2000; Patel y col., 2002). En base a estos antecedentes estudiamos si la adición de 15dPGJ<sub>2</sub> agonista endógeno de PPAR $\gamma$ , era capaz de modular los niveles de MMP-2 y MMP-9 en los tejidos de la unidad feto-placentaria de ratas control y diabéticas. Los resultados de este estudio indicaron que tanto los niveles de MMP-2 y MMP-9 como su actividad, disminuyen en presencia de 15d-PGJ<sub>2</sub> en la placenta de animales diabéticos. Sin embargo, los niveles y actividad MMPs no presentaron cambios en la placenta de animales control. Estos resultados sugieren que la acción de esta prostaglandina es mayor en los tejidos diabéticos, en los cuales su producción es deficiente.

En los fetos de ratas controles y diabéticas, la adición de 15d-PGJ<sub>2</sub> produce una disminución en los niveles y actividad de MMP-2, regulación que se evidencia en mayor medida en los fetos procedentes de madres diabéticas. *Estos resultados sugieren una respuesta diferencial en cuanto a la sensibilidad de reacción de las MMPs fetales a estos agentes regulatorios, y evidencian la posibilidad de controlar la sobreactivación proteásica, probablemente vinculada a las anomalías en el desarrollo fetal que son*

Los mecanismos por los cuales los ligandos de PPAR $\gamma$  pueden disminuir la expresión de MMPs aun no han sido dilucidados y serán objeto de futuros estudios. Datos aportados por Ricote y col., sugieren que PPAR $\gamma$  provoca la transrepresión de los sitios de AP-1 (proteína activadora-1) y/o NF $\kappa$ B presentes en el promotor de MMP-9 (Ricote y col.,

1998), mientras que estudios más recientes muestran la presencia de dos posibles sitios PPRE (elementos de respuesta a PPAR) en el promotor de MMP-9 en la rata (Eberhardt y col., 2002). En caso de corroborarse dicha hipótesis, la acción de PPAR $\gamma$  podría ser directa, por medio de la unión del dímero PPAR $\gamma$ -RXR al promotor de la MMP.

La degradación de la matriz extracelular depende del balance entre las MMP activas y la presencia de sus inhibidores. En este trabajo estudiamos los niveles de TIMPs y su regulación por 15d-PGJ<sub>2</sub> en la unidad feto-placentaria control y diabética.

De la evaluación realizada con respecto a los TIMPs, solamente pudo evidenciarse la presencia de TIMP-1, tanto en las placentas de ratas control como diabéticas, hallándose sus niveles disminuidos en esta última. Ningún TIMP fue localizado en los fetos provenientes de ratas control y diabéticas usando la técnica de zimografía reversa. Otros autores reportaron la presencia de TIMP-2 y TIMP-3 en tejidos fetales a mediados de la gestación, aunque éstos fueron evaluados empleando técnicas más sensibles, como ELISA y RT-PCR (Ryu y col., 2005).

15d-PGJ<sub>2</sub> fue capaz de incrementar los niveles de TIMP-1 en tejido placentario de ratas diabéticas, pero este incremento no fue observado en la placenta de los animales control. Un efecto similar fue encontrado por Worley y col., en las células THP-1 (línea celular de monocitos humanos). En estas células la adición de 15d-PGJ<sub>2</sub> no promueve el incremento de TIMP-1, sin embargo cuando estas células fueron estimuladas con PMA (12-miristato 13-acetato de forbol), que incrementa la expresión de MMPs, la 15d-PGJ<sub>2</sub> aumentó la expresión del TIMP estudiado (Worley y col., 2003). **En base a estos resultados se puede inferir que la 15d-PGJ<sub>2</sub> es capaz de incrementar los niveles de TIMP-1 en presencia de elevados niveles de MMPs. De esta manera, el ligando endógeno de PPAR $\gamma$  podría disminuir en forma conjunta los niveles y la actividad de las MMPs, representando un mecanismo de control adecuado para prevenir la sobreactivación de estas enzimas. Sin embargo, este recurso se ve limitado por los**

**bajos niveles endógenos del prostanoide en tejido fetal y placentario de animales diabéticos y en placentas de mujeres diabéticas a término.**

*La activación de PPAR $\gamma$  disminuye los niveles de MMPs e incrementa los niveles de TIMP-1 en la unidad feto-placentaria diabética, en la cual estas colagenasas se encuentran aumentadas. Nuestros estudios sugieren que 15d-PGJ<sub>2</sub> y/o la activación de los receptores PPAR $\gamma$  tienen un papel importante en la regulación de los niveles y actividad de las MMPs en los tejidos diabéticos.*



## ∞Conclusión∞

En el presente estudio hemos evaluado las alteraciones de las metaloproteinasas presentes en la unidad feto-placentaria a mediados de la gestación diabética, momento próximo posterior al establecimiento pleno de las funciones de transferencia materno-fetal de la placenta corioalantoidea. En esta etapa tanto el feto como la placenta están sufriendo activos procesos de remodelación de la MEC y de reestructuración tisular, en los cuales la actividad metaloproteásica adquiere particular importancia.

De manera interesante los resultados obtenidos muestran que las metaloproteinasas 2 y 9 se expresan y activan de manera estrictamente diferencial en las placas componentes de la placenta y en el feto, evidenciando una delicada regulación espacial de estas proteasas en la unidad feto-placentaria.

A través de estas primeras aproximaciones, se perfila un interesante campo de estudio en el que las MMPs podrían revelarse como factores cruciales para el desarrollo del feto durante la gestación. Un cuidadoso análisis sobre el significado y los mecanismos específicos de esta regulación podrá aportar en el futuro un panorama más claro acerca del verdadero alcance de las funciones llevadas a cabo por la placenta y de la intervención de la MEC en cuanto a la regulación del desarrollo fetal.

La hiperglucemia materna se muestra una vez más como agente inductor de alteraciones en la actividad de enzimas que regulan procesos de importancia en el

curso de la gestación. En este caso, la sobreactivación de MMPs implica un incremento de la actividad proteásica, originando posiblemente una inadecuada remodelación del tejido placentario. Estos mecanismos podrían facilitar la formación de nuevas microvellosidades de baja eficiencia en sus funciones de intercambio, estructuras características de la placenta en la gestación diabética, y que le otorgan un sello de “inmadurez” estructural y funcional. Se destaca asimismo la importancia de las MMPs en la formación de órganos fetales, y la posible implicancia de alteraciones en la actividad metaloproteásica sobre la inducción de dismorfogénesis fetal, característica de la gestación diabética.

En este estudio observamos un importante incremento de las especies reactivas del oxígeno y del daño inducido por peroxinitritos en el tejido placentario y fetal de los animales diabéticos. A través de este análisis hemos evidenciado asimismo que las metaloproteinasas muestran una diferente susceptibilidad a la sobreinducción por incremento del estrés oxidativo y nitrosativo. Efectivamente, las gelatinasas localizadas en la placa placentaria fetal son más resistentes a dicho impacto que aquellas situadas en la placa materna de la placenta, sugiriendo que este órgano actúa como una barrera protectora frente a este desbalance tendiendo a amortiguar el impacto de estas especies altamente dañinas sobre el feto.

El correcto desempeño de la placenta en su rol de barrera de protección del feto en desarrollo sería fundamental si consideramos que en este último, la actividad de las MMPs puede ser rápidamente modificada por la acción de los diversos agentes moduladores ensayados en este estudio evidenciando una alta susceptibilidad a la desregulación por parte de las MMPs fetales.

Sin embargo, este efecto adverso del incremento de las especies oxidantes no puede ser totalmente prevenido, como parece sugerir la aparición de la actividad

MMP-2 en la placa fetal de las placentas provenientes de ratas diabéticas (ausente en los animales sanos), y en el incremento de actividad gelatinásica en los fetos de madres diabéticas con respecto al control.

Este hecho estaría en relación con la capacidad de los agentes oxidantes de alterar la estabilidad de la unión  $Zn^{2+}$ -cisteína en el núcleo catalítico que mantiene inactivo el zimógeno de las MMPs, demostrando la potencialidad de daño que lleva implícito el estrés oxidativo y nitrosativo en la gestante diabética.

Nuestros resultados muestran que 15d-PGJ<sub>2</sub>, ligando endógeno de los receptores PPAR $\gamma$  sería un importante modulador de procesos de remodelación tisular en la unidad feto-placentaria, a través de la regulación negativa de la actividad MMPs y del incremento de la actividad de sus inhibidores endógenos específicos. Observamos asimismo que la unidad feto-placentaria de animales diabéticos produce bajos niveles de 15d-PGJ<sub>2</sub>, ligando endógeno de los receptores PPAR $\gamma$ . En tal sentido se abre un interesante campo de estudio en cuanto a la participación de los receptores PPAR $\gamma$  en el desarrollo fetal y placentario, y se evidencia la posibilidad de que la disfunción de dichos receptores y/o el desbalance en el metabolismo del ácido araquidónico (precursor de 15dPGJ<sub>2</sub>) sean factores involucrados en las alteraciones feto-placentarias inducidas por la hiperglucemia materna en la gestación.

***Finalmente podemos concluir que la diabetes materna induce un importante incremento en la expresión y la actividad de MMP-2 y MMP-9 en la unidad feto-placentaria. Este incremento parece ser el resultado de un desbalance en***

*sus factores moduladores, caracterizado por aumento de ROS y NO (moduladores positivos) y disminución de los niveles de 15d-PGJ<sub>2</sub> (regulador negativo). De tal manera se abre un interesante camino para el estudio de nuevas acciones terapéuticas que conduzcan a la normalización de estos factores moduladores.*

*Dado que las MMPs cumplen un rol fundamental en la remodelación de la matriz extracelular y en la reestructuración tisular que tiene lugar durante la morfogénesis y el desarrollo placentario, las alteraciones en la producción y función de las MMPs posiblemente estén vinculadas con el aumento en la incidencia de lesiones placentarias y dismorfogénesis embrionarias características en la gestación diabética.*

## ∞BIBLIOGRAFÍA ∞

Abrahamsohn PA, Zorn TMT. (1993). Implantation and decidualization in rodents. *Journal of Experimental Zoology* 266: 603-628.

Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.

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

Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP, Werb Z. (1996). Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal boundary during mouse implantation. *Development* 122: 1723-1736.

Babaei S, Stewart DJ. (2002). Overexpression of endothelial NO synthase induces angiogenesis in a co-culture model. *Cardiovascular Research* 55: 190–200.

Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. (1998). Divergent effects of TIMP-1, -2, -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro: TIMP-3 promotes apoptosis. *Journal of Clinical Investigation* 101: 1478–1487.

Banerjee S, Ghosh US, Banerjee D. (2004). Effect of tight glycaemic control on fetal complications in diabetic pregnancies. *Journal of the Associated Physicians India* 52: 109-113.

Barahona MJ, Sucunza N, Garcia-Patterson A, Hernandez M, Adelantado JM, Ginovart G, De Leiva A, Corcoy R. (2005). Period of gestational diabetes mellitus diagnosis and maternal and fetal morbidity. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica* 84: 622-627.

Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. (1999). PPAR $\gamma$  is required for placental, cardiac and adipose tissue development. *Molecular Cell* 4: 585-595.

Barlier-Mur AM, Chailley-Heu B, Pinteur C, Henrion-Caude A, Delacourt C, Bourbon JR. (2003). Maturation factors modulate transcription factors CCAAT/enhancer-binding proteins alpha, beta, delta, and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in fetal rat lung epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 29(5): 620-6.

Barrett AJ. (1981).  $\alpha$ 2-macroglobulin. *Methods in Enzymology* 80: 737-754.

Baylis C, Vallance P. (1998a). Measurement of nitrite and nitrate levels in plasma and urine: what does this measure tell us about the activity of endogenous nitric oxide system? *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 7:59-66.

Baylis C, Beinder E, Suto T, August P. (1998b). Recent insights into the roles of nitric oxide and renin-angiotensin in the pathophysiology of preeclamptic pregnancy. *Seminaries of Nephrology* 18: 208-230.

Berry EB, Eykholt R, Helliwell RJA, Gilmour RS, Mitchell MD, Marvin KW. (2003). Peroxisome proliferator activated receptor isoform expression changes in human gestational tissues with labor at term. *Molecular Pharmacology* 64: 1586-1590.

Blankenship TN, King BF. (1994). Identification of 72-kilodalton type IV collagenase at sites of trophoblastic invasion of macaque spiral arteries. *Placenta* 15: 177-187.

Blankenship TN, Enders AC. (1997). Trophoblast cell-mediated modifications to uterine spiral arteries during early gestation in the macaque. *Acta Anatomica (Basel)* 158: 227-236.

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

Bonadonna RC, De Fronzo RA. (1991). Glucose metabolism in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes Metabolism* 17: 112-135.

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

Boucher A, Lu D, Burgess SC, Telemaque-Potts S, Jensen MV, Mulder H, Wang MY, Unger RH, Sherry AD, Newgard CB. (2004). Biochemical mechanism of lipid-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion and reversal with a malate analogue. *Journal of Biological Chemistry* 279: 27263-27271.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Brelje TC, Scharp DW, Lacy PE, Ogren L, Talamantes F, Robertson M, Friesen HG, Sorenson RL. (1993). Effect of homologous placental lactogens, prolactins, and growth hormones on islet B-cell division and insulin secretion in rat, mouse, and human islets: implication for placental lactogen regulation of islet function during pregnancy. *Endocrinology* 132: 879-887.

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

Buchanan TA. (1991). Glucose metabolism during pregnancy: normal physiology and implications for diabetes mellitus. *Israel Journal of Medical Sciences* 27: 432-441.

Buhimschi I, Ali M, Jain V, Chwalisz K, Garfield RE. (1996). Differential regulation of nitric oxide in the rat uterus and cervix during pregnancy and labour. *Human Reproduction* 11: 1755-1766.

Buhimschi IA, Kramer WB, Buhimschi CS, Thompson LP, Weiner CP. (2000). Reduction-oxidation (redox) state regulation of matrix metalloproteinase activity in human fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 182: 458-464.

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



Bustamante SA, Pang Y, Romero S, Pierce MR, Voelker Ca, Thompson JH, Sandoval M, Liu X, Millar MJS. (1996). Inducible nitric oxide synthase and the regulation of central vessels caliber in the fetal rat. *Circulation* 94:1948-1953.

Calvillán M, Durruty P, Lopez G, Rocha G. (1991). Insulin sensitivity in vivo: evaluation of non insulin dependent diabetes mellitus patients and healthy subjects by euglycemic hyperinsulinemic clamp. *Revista Médica de Chile* 119: 1101-1108.

Capobianco E, Jawerbaum A, Romanini MC, White V, Pustovrh C, Higa R, Martinez N, Mugnaini MT, Soñez C, Gonzalez E. (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. *Reproduction, Fertility and Development* 17: 423-433.

Carlson MC. (2000). Embriología Humana y Biología del Desarrollo. 2° edición. Ediciones Harcourt S.A.

Cederberg J, Basu S, Eriksson UJ. (2001). Increased rate of lipid peroxidation and protein carbonylation in experimental diabetic pregnancy. *Diabetologia* 44: 766-774.

Chang TI, Horal M, Jain SK, Wang F, Patel R, Loeken MR. (2003). Oxidant regulation of gene expression and neural tube development: Insights gained from diabetic pregnancy on molecular causes of neural tube defects. *Diabetologia* 46: 538-545.

Chi MM, Hoehn A, Moley KH. (2002). Metabolic changes in the glucose-induced apoptotic blastocyst suggest alterations in mitochondrial physiology. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism* 283: E226-232.

Chin JR, Werb Z. (1997). Matrix metalloproteinases regulate morphogenesis, migration and remodeling of epithelium, tongue skeletal muscle and cartilage in the mandibular arch. *Development* 124: 1519-1530.

Chrapko W, Jurasz P, Radomski MW, Archer SL, Newman SC, Baker G, Lara N, Le Melledo JM. (2005). Alteration of decreased plasma NO metabolites and platelet NO synthase activity by paroxetine in depressed patients *Neuropsychopharmacology* publicación on line Nov 23.

Comi RJ, Grunberger G, Gorden P. (1987). Relationship of insulin binding and insulin-stimulated tyrosine kinase activity is altered in type II diabetes. *Journal of Clinical Investigation* 79: 453-462.

Corbett JA, Mc Daniel ML. (1992). Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of beta-cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. *Diabetes* 41: 897-903.

Coughlan MT, Vervaart PP, Permezel M, Gergiou HM, Rice GE. (2004). Altered placental oxidative stress status in gestational diabetes mellitus. *Placenta* 25: 78-84.

Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. (1994). Implantation and the placenta: key pieces of the developmental puzzle. *Science* 266: 1506-1518.

Das SK, Yano S, Wang J, Edwards DR, Nagase H, Dey SK. (1997). Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *Developmental Genetics* 21: 44-54.

Davis KJ. (1995). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposia* 61: 1-31.

Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH. (1991). Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88:6368-6371.

de Jager CA, Linton EA, Spyropoulou I, Sargent IL, Redman CW. (2003). Matrix metalloprotease-9, placental syncytiotrophoblast and the endothelial dysfunction of pre-eclampsia. *Placenta* 24: 84-91.

DellaCorte C, Kalinoski DL, Huque T, Wysocki L, Restrepo D. (1995). NADPH diaphorase staining suggests localization of nitric oxide synthase within mature vertebrate olfactory neurons. *Neuroscience* 66: 215-225.

Demers LM, Gabbe SG, Villee CA, Greep RO. (1973). Human chorionic gonadotropin-mediated glycogenolysis in human placental villi: a role of prostaglandins. *Biochimica et Biophysica Acta* 313: 202-210.

Derosa G, Avanzini MA, Geroldi D, Fogari R, Lorini R, De Silvestri A, Tinelli C, Rondini G, d'Annunzio G. (2005). Matrix metalloproteinase 2 may be a marker of microangiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 70: 119-125.

Desoye G & Shafir E. (1996). The human placenta in diabetic pregnancy. *Diabetes reviews* 4: 70-89.

Desoye G, Korgun ET, Ghaffari-Tabrizi N, Hahn T. (2002). Is fetal macrosomia in adequately controlled diabetic women the result of aplacental defect?--a hypothesis. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine* 11(4): 258-61.

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

Diamant YZ, Neuman S, Shafrir E. (1975b). Effect of chorionic gonadotropin, triamcinolone, progesterone and estrogen on enzymes of placenta and liver in rats. *Biochemica et Biophysica Acta* 385: 257-267.

Eberhardt W, Akool E, Rebhan J, Frank S, Beck KF, Franzen R, Hamada FM, Pfeilschifter J. (2002). Inhibition of cytokine-induced matrix metalloproteinase 9 expression by peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists is indirect and due to a NO-mediated reduction of mRNA stability. *Journal of Biological Chemistry* 277 (36): 33518-33528.

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

Efendic S, Wajngot A, Vranic M. (1985). Increased activity of the glucose cycle in the liver: early characteristic of type 2 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82: 2965-2969.

El-Hage S, Singh S.M. (1990). Temporal expression of genes encoding free radical-metabolizing enzymes is associated with higher mRNA levels during in utero development in mice. *Developmental Genetics* 11: 149-159.

Enders AC, Blankenship TN. (1999) Comparative placental structure. *Advanced Drug Delivery Reviews* 38: 3-15.

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

Eriksson UJ, Siman CM. (1996). Pregnant diabetic rats fed the antioxidant butylated hydroxytoluene show decreased occurrence of malformations in offspring. *Diabetes* 45: 1497-1502.

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

Federici M, Hribal M, Perego L, Ranalli M, Caradonna Z, Perego C, Usellini L, Nano R, Bonini P, Bertuzzi F, Marlier LN, Davalli AM, Carandente O, Pontiroli AE, Melino G, Marchetti P, Lauro R, Sesti G, Folli F. (2001). High glucose causes apoptosis in cultured human pancreatic islets of Langerhans: a potential role for regulation of specific Bcl family genes toward an apoptotic cell death program. *Diabetes* 50(6): 1290-301.

Finck BN, Lehman JJ, Leone TC, Welch MJ, Bennett MJ, Kovacs A, Han X, Gross RW, Kozak R, Lopaschuk GD, Nelly DP. (2002). The cardiac phenotype induced by PPAR  $\alpha$  overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation* 109: 121-130.

Fine EL, Horal M, Chang TI, Fortin G, Loeken MR. (1999). Evidence that elevated glucose causes altered gene expression, apoptosis, and neural tube defects in a mouse model of diabetic pregnancy. *Diabetes* 48:2454-2462.

Folgueras AR, Alberto M, Pendás AM, Luis M Sánchez LM, López-Otín C. (2004). Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *International Journal of Developmental Biology* 48: 411- 424.

Forsberg H, Wentzel P, Eriksson UJ. (1998). Maternal diabetes alters extracellular matrix protein levels in rat placentas. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 179: 772-778.

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

Freinkel N. (1980). Of pregnancy and progeny. *Diabetes* 29: 1023-1035.

Galewska Z, Bankowski E, Romanowicz L, Jaworski S. (2003). Pre-eclampsia (EPH-gestosis)-induced decrease of MMP-s content in the umbilical cord artery. *Clinica Chimica Acta* 335: 109-115.

Ganser GL, Stricklin GP, Matrisian LM. (1991). EGF and TGF alpha influence in vitro lung development by the induction of matrix-degrading metalloproteinases. *International Journal of Developmental Biology* 35(4): 453-461.

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

Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A. (2005). Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Laboratory Investigation* 85: 597-607.

Gilbert SF. (2000). *Developmental Biology*. 6<sup>a</sup> Ed. Sinauer Associates.

Giordano FJ. (2005). Oxygen, oxidative stress, hypoxia and heart failure. *Journal of Clinical Investigation* 115: 500-508.

Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19: 257-267.

Goldman S, Weiss A, Eyali V, Shalev E. (2003). Differential activity of the gelatinases (matrix metalloproteinases 2 and 9) in the fetal membranes and decidua, associated with labour. *Molecular Human Reproduction* 9: 367-373.

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

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

Gonzalez E, Rosello-Catafau J, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, Vela J, White V, Xaus C, Peralta C, Gimeno M. (2000). Pancreatic nitric oxide and oxygen free radicals in the early stages of streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33(11): 1335-42.

González E, Rosello-Catafau J, Jawerbaum A, Vela J, Sinner D, Pustovrh C, White V, Xaus C, Peralta C, Gimeno M. (2001a). Involvement of inducible isoforms of COX and NOS in streptozotocin-pancreatic damage in the rat: interactions between nitridergic and prostanoid pathway. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids* 64: 311-316.

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

Green LC, Wagner DA, Glogowski J. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry* 126: 131-138.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. (2000). NADPH oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research* 86: 494-501.

Gross SS, Wolin MS. (1995). Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annual Review of Physiology* 57: 737-769.

**Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science* 297: 1186-1190.**

Gumbiner BM. (1992). Epithelial morphogenesis. *Cell* 69: 385-387.

Halliwell B. (1997). Antioxidants and human disease: A general introduction. *Nutrition Reviews* 55: S44-52.



Hashimoto K, Ethridge RT, Evers BM. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand inhibits cell growth and invasion of human pancreatic cancer cells. *International Journal of Gastrointestinal Cancer* 32: 7-22.

Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. (2000). Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radical Biology & Medicine* 28:1456-1462.

Holmbeck K, Bianco P, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H. (2003). MT1-MMP-dependent, apoptotic remodeling of unmineralized cartilage: a critical process in skeletal growth. *Journal of Cell Biology* 163: 661-671.

Holmqvist B, Ellinsen B, Forsell J, Zhdanova I, Alm P. (2004). The early ontogeny of neuronal nitric oxide synthase systems in the zebrafish. *Journal of Experimental Biology* 207: 923-935.

Hotary K, Allen E, Punturieri A, Yana I, Weiss SJ. (2000). Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2 and 3. *Journal of Cell Biology* 149: 1309-1323.

Hsu TC, Young MR, Cmarik J, Colburn NH. (2000). Activator protein 1 (AP-1) and nuclear factor kappaB (NF-kappaB)-dependent transcriptional events in carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine* 28: 1338-1348.

Huin C, Corriveau L, Bianchi A, Keller JM, Collet P, Kremarik-Bouillaud P, Domenjoud L, Becuwe P, Schohn H, Menard D, Dauca M. (2000). Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in the developing human fetal digestive tract. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 48(5): 603-611.

Hulboy DL, Rudolph LA, Matrisian LM. (1997). Matrix metalloproteinases as mediators of reproductive function. *Molecular Human Reproduction* 3: 27-45.

Ignarro LJ. (1990). Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 30: 535-560.

Inada A, Nagai K, Arai H, Miyazaki J, Nomura K, Kanamori H, Toyokuni S, Yamada Y, Bonner-Weir S, Weir GC, Fukatsu A, Seino Y. (2005). Establishment of a diabetic mouse model with progressive diabetic nephropathy. *American Journal of Pathology* 167: 327-336.

Inui S, Lee YF, Chang E, Shyr CR, Chang C. (2003). Differential and bi-directional regulation between TR2/TR4 orphan nuclear receptors and a specific ligand mediated-peroxisome proliferator-activated receptor alpha in human HaCaT keratinocytes. *Journal of dermatological science* 31(1): 65-71.

Ischiropoulos H, Zhu L, Chen J, Tsai M, Martin J, Smith C, Beckman JS. (1992). Peroxynitrite-mediated tyrosine nitration catalyzed by superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 298: 431-437.

Jawerbaum A, Roselló-Catafau J, Gonzalez E, Novaro V, Gomez G, Gelpi E, Gimeno MA. (1996). Eicosanoid production, metabolism and contractile activity in the isolated uterus from non-insulin-dependent diabetic rats during late pregnancy. *Prostaglandins* 51: 307-320.

Jawerbaum A, Gonzalez ET, Novaro V, Faletti A, Gimeno MA. (1998). Nitric oxide mediates increased prostaglandin E production by oocyte-cumulus complexes in the

non-insulin-dependent diabetic rat. *Reproduction, Fertility and Development* 10(2): 185-90.

Jawerbaum A, Gonzalez ET, Sinner D, Pustovrh C, White V, Gimeno MA. (2000). Diminished PGE<sub>2</sub> content, enhanced PGE<sub>2</sub> release and defects in 3H-PGE<sub>2</sub> transport in embryos from overtly diabetic rats. *Reproduction, Fertility and Development* 12(3-4): 141-7.

Jawerbaum A, Sinner D, White V, Pustovrh C, Capobianco E, Gimeno MA, Gonzalez ET. (2001). Modulation of PGE<sub>2</sub> generation in the diabetic embryo: effect of nitric oxide and superoxide dismutase. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 64(2): 127-133.

Jawerbaum A, Sinner D, White V, Pustovrh C, Capobianco E, Gonzalez E. (2002). Modulation of nitric oxide concentration and lipid metabolism by 15-deoxy  $\Delta^{12,14}$  prostaglandin J<sub>2</sub> in embryos from control and diabetic rats during early organogenesis. *Reproduction* 124: 625-631.

Jawerbaum A, Capobianco E, Pustovrh C, White V, Baier M, Salzberg S, Pesaresi M, Gonzalez E. (2004). Influence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation by its endogenous ligand 15-deoxy  $\Delta^{12,14}$  prostaglandin J<sub>2</sub> on nitric oxide production in term placental tissues from diabetic women. *Molecular Human Reproduction* 10: 671-676.

Jawerbaum A, González E. (2005a). The role of alterations in arachidonic acid metabolism and nitric oxide homeostasis in rat models of diabetes during early pregnancy. *Current Pharmaceutical Design* 11: 1327-1342.

Jawerbaum A, Higa R, White V, Capobianco E, Pustovrh C, Sinner D, Martinez N, Gonzalez E. (2005b). Peroxynitrites and impaired modulation of nitric oxide concentrations in embryos from diabetic rats during early organogenesis. *Reproduction* 130: 695-703.

Jha HC, von Recklinghausen G, Zilliken F. (1985). Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids. *Biochemical Pharmacology*. 34(9): 1367-9.

Jian LK, Rosenberg GA. (2005). Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radical Biology & Medicine* 39: 71-80.

Jiang C, Ting AT, Seed B. (1998). PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 391: 82-86.

Jin M, Kashiwagi K, Iizuka Y, Tanaka Y, Imai M, Tsukahara S. (2001). Matrix metalloproteinases in human diabetic and nondiabetic vitreous. *Retina* 21: 28-33.

Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. (2005). Oxidative stress and the use of oxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology* 4: 5.

Jones SP, Bolli R. (2005). The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* (publicación on line).

Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. (1967). Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* 126: 201-205.

Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. (1969). Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *Journal of Clinical Investigation* 48: 2129-2139.

Kalkhoff RK. (1982). Metabolic effects of progesterone. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 142: 735-738.

Kato R, Momiyama Y, Ohmori R, Taniguchi I, Nakamura H, Ohzusu F. (2005). Plasma matrix metalloproteinase-8 concentrations are associated with the presence and severity of coronary artery disease. *Circulation Journal* 69: 1035-1040.

Kaufmann S, Ewing C, Shaper J. (1987). The Erasable Western Blot. *Analytical Biochemistry* 161: 89-95.

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

Kaufmann P, Black S, Huppertz B. (2003). Endovascular Trophoblast Invasion: Implications for the Pathogenesis of Intrauterine Growth Retardation and Preeclampsia. *Biology of Reproduction* 69: 1-7.

Khan JY, Black S. (2003). Developmental changes in murine brain antioxidant enzymes. *Pediatric Research* 54: 77-82.

Kheradmand F, Rishi K, Werb Z. (2002). Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP-2. *Journal of Cell Science* 115: 839-848.

Kiewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. (1995). A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 85: 813-819.

Kinalska M, Sledziewski A, Telejko B, Kowalska I, Kretowski A, Zarzycki W, Kinalska I. (2001). Lipid peroxidation, antioxidant defence and acid-base status in cord blood at birth: the influence of diabetes. *Hormone and metabolic research* 33(4): 277-231.

King H, Aubert RE, Herman WH. (1998). Global Burden of Diabetes, 1995-2025. *Diabetes Care* 21: 1414-1431.

Kirby DRS. (1965). The 'invasiveness' of the trophoblast. The early conceptus, normal and abnormal. (ed. W. W. Park), pp. 68-74.

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

Klein DJ, Aronson Friedman L, Harlan WR, Barton BA, Schreiber GB, Cohen RM, Harlan LC, Morrison JA. (2004). Obesity and the development of insulin resistance and impaired fasting glucose in black and white adolescent girls: a longitudinal study. *Diabetes Care* 27: 378-383.

Kliwer SA, Xu HE, Lambert MH, Willson TM. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor: from genes to physiology. *Recent Progress in Hormone Research* 56: 239-263.

Knauf C, Prevot V, Stefano GB, Mortreux G, Beauvillain JC, Croix D. (2001). Evidence for a spontaneous nitric oxide release from the rat median eminence: influence on gonadotropin-releasing hormone release. *Endocrinology* 142:2343-2350.

Kossenjans W, Eis A, Sahay R, Brockman D, Myatt L. (2000). Rol of peroxinitrite in altered fetal-placental vascular reactivity in diabetes and preeclampsia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 278: H1311-H1319.

Krey G, Braissant O, L'Horset F, Kalkhoven E, Perroud M, Parker MG, Wahli W. (1997). Fatty acids, eicossanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferators-activated receptors by co-activator-dependent receptor ligant assay. *Molecular Endocrinology* 11: 779-791.

Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen. (1997). Nitric Oxide: Cytotoxicity versus Cytoprotection. How, Why, When and Where? *Nitric Oxide: Biology and Biochemistry* 1: 107-120.

Laurent M, Lepolvre M, Tenu JP. (1996). Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated in vitro by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. *Biochemical Journal* 314: 109-113.

Lee QP, Park HW, Thayer J, Mirkes P, Juchau MR. (1996). Apoptosis induced in cultured rat embryos by intra-amniotically microinjected sodium nitroprusside. *Teratology* 53: 21-30.

Leturque A, Hauguel S, Sutter Dub MT, Maulard P, Girard J. (1989). Effects of placental lactogen and progesterone on insulin stimulated glucose metabolism in rat muscles in vitro. *Diabetes Metabolism* 15: 176-181.

Liu H, Zang C, Fenner MH, Possinger K, Elstner E. (2003). PPARgamma ligands and ATRA inhibit the invasion of human breast cancer cells in vitro. *Breast Cancer Research and Treatment* 79: 63-74.

Lockwood TD. (2000). Redox control of protein degradation. *Antioxidant and Redox Signaling* 2: 851-878.

Lyll F, Gibson J, Greer I, Brockman D, Eis A, Myatt L. (1998). Increased nitrotyrosine in the diabetic placenta. Evidence for oxidative stress. *Diabetes Care* 21: 1753-1758.

Malassiné A, Frenedo JL, Evain-Brion D. (2003). A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Human Reproduction Update* 9: 531-539.

Maloff BL, Boyd BK. (1986). Physiological and cellular insulin actino in a glucose intolerant model of type 2 (non insulin dependent) diabetes in rats. *Diabetologia* 29: 295-300.

Manabe S, Gu Z, Lipton SA. (2005). Activation of Matrix Metalloproteinase-9 via Neuronal Nitric Oxide Synthase Contributes to NMDA-Induced Retinal Ganglion Cell Death. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46: 4747-4753.

Marcet-Palacios M, Graham K, Cass C, Befus AD, Mayers I, Radomski MW. (2003). Nitric oxide and cyclic GMP increase the expression of matrix metalloproteinase-9 in



vascular smooth muscle. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 307: 429-436.

Marx, N., Sukhova, G., Murphy, C., Libby, P., and Plutzky, J. (1998). Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *The American Journal of Pathology* 153: 17-23.

McGarry D. (2002). Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 Diabetes. *Diabetes* 51: 7-18.

McNeill JH. (1999). Streptozotocin-induced diabetes: Induction, mechanisms and dose dependency. Ch 1, Section 1, Experimental models of diabetes CRC Press LLC 3-19.

Merchant SJ, Davidge ST. (2004). The role of matrix metalloproteinases in vascular function: implications for normal pregnancy and pre-eclampsia. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynecology* 111:931-939.

Merz WE. (1994). The primate placenta and human chorionic gonadotropin. *Experimental and Clinical Endocrinology* 102: 222-234.

Micahlik L, Desvergne B, Dreyer C, Gavillet M, Laurini RN, Wahli W. (2002). PPAR expression and function during vertebrate development. *International Journal of Developmental Biology* 46: 105-114.

Mills JL. (1982). Malformation in infants of diabetic mothers. *Teratology* 25: 385-394.

Miralles F, Battekino T, Czernichow P, Scharfmann R. (1998). TGF- $\beta$  Plays a Key Role in Morphogenesis of the Pancreatic Islets of Langerhans by Controlling the Activity of the Matrix Metalloproteinase MMP-2. *Journal of Cell Biology* 143:827-836.

Misra HP, Fridovich I. (1972). The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 247(10): 3170-3175.

Moley KH. (2001). Hyperglycemia and apoptosis: mechanisms for congenital malformations and pregnancy loss in diabetic women. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 12: 78-82.

Molin DG, Roest PA, Nordstrand H, Wisse LJ, Poelmann RE, Eriksson UJ, Gittenberger-De Groot AC. (2004). Disturbed morphogenesis of cardiac outflow tract and increased rate of aortic arch anomalies in the offspring of diabetic rats. *Birth Defects Research part A: Clinical and Molecular Teratology* 70: 927-938.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews* 43: 109-142.

Morris BJ, Simpson CS, Mundell S, MacEachern K, Johnston HM, Nolan AM. (1997). Dynamic changes in NADPH-diaphorase staining reflect activity of nitric oxide synthase: evidence for a dopaminergic regulation of striatal nitric oxide release. *Neuropharmacology* 36: 1589-1599.

Mott JD, Thomas CL, Rosenbach MT, Takahara K, Greenspan DS, Banda MJ. (2000). Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer

releases a metalloproteinase inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 275: 1384-1390.

Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR Jr. (1997). Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *Journal of Biological Chemistry* 272: 8071-8076.

Myatt L, Brewer AS, Brockman DE. (1991). The action of nitric oxide on the perfused human fetal-placenta circulation. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 64: 687-692.

Myatt L, Kossenjans W, Sahay R, Eis A, Brockman D. (2000). Oxidative stress causes vascular dysfunction in the placenta. *The Journal of Maternal-Fetal Medicine* 9: 79-82.

Myatt L, Cui X. (2004). Oxidative stress in the placenta. *Histochemistry and Cell Biology* 122: 369-382.

Nagase H., Woessner JF Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry* 274: 21491-21494.

Nakanishi Y, Sugiura F, Kishi J, Hayakawa T. (1986). Collagenase inhibitor stimulates cleft formation during early morphogenesis of mouse salivary gland. *Developmental Biology* 113: 201-206.

Nelson K, Melendez A. (2004). Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases. *Free Radical Biology and Medicine* 37: 768-784.

Nemeth JA, Goolsby CL. (1993). TIMP-2, a growth-stimulatory protein from SV40 transformed human fibroblasts. *Experimental Cell Research* 207: 376–382.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. (2000). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787-790.

Noda K, Ishida S, Inoue M, Obata K, Oguchi Y, Okada Y, Ikeda E. (2003). Production and activation of metalloproteinase-2 in proliferative diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 44: 2163-2170.

Nordberg J, Arner ES. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine* 31: 1287-1312.

Noris M, Benigni A, Remuzzi G. (1996). The role of vasoactive molecules of endothelial origin in the pathophysiology of normal pregnancy and pregnancy-induced hypertension. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 5: 347–352.

Noris M, Todeschini M, Cassis P, Pasta F, Cappellini A, Bonazzola S, Macconi D, Maucci R, Porrati F, Benigni A, Picciolo C, Remuzzi G. (2004). L-Arginine Depletion in Preeclampsia Orients Nitric Oxide Synthase Toward Oxidant Species *Hypertension* 43: 614-622.

Novaro V, González E, Jawerbaum A, Rettori V, Canteros G, Gimeno MF. (1997). Nitric oxide synthase regulation during embryonic implantation. *Reproduction, Fertility & Development* 9: 557-564.

Novaro V, Colman-Lerner A, Ortega FV, Jawerbaum A, Paz D, Lo Nostro F, Pustovrh C, Gimeno MF, Gonzalez E. (2001). Regulation of metalloproteinases by nitric oxide in human trophoblast cells in culture. *Reproduction, Fertility and Development* 13: 411-420.

Novaro V, Pustovrh C, Colman-Lerner A, Radisky D, Lo Nostro F, Paz D, Jawerbaum A, González E. (2002). Nitric oxide induces gelatinase A (matrix metalloproteinase 2) during rat embryo implantation. *Fertility and Sterility* 78(6): 1278-1287.

Ogando DG, Paz D, Cella M, Franchi AM. (2003). The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice. *Reproduction* 125: 95-110.

Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura s, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB. (2001). The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 107: 789-800.

Okamoto T, Niu R, Yamada S, Osawa M. (2002). Reduced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 in gestational trophoblastic diseases. *Molecular Human Reproduction* 8: 392-398.

Orci L, Junod A, Pictet R, Renold AE, Rouiller C. (1968). Granulolysis in cells of endocrine pancreas in spontaneous and experimental diabetes in animals. *Journal of Cell Biology* 38: 62-66.

Ornoy A, Zaken V, Kohen R. (1999). Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzymes

and low-molecular-weight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology* 60: 376-386.

Padmanabhan R, Shafiullah M. (2001). Intrauterine growth retardation in experimental diabetes: possible role of the placenta. *Archives of Physiology and Biochemistry* 109 (3): 260-71.

Patel L, Charlton SJ, Marshall IC, Moore GB, Coxon P, Moores K, Clapham JC, Newman SJ, Smith SA and Macphee CH. (2002). PPARgamma is not a critical mediator of primary monocyte differentiation or foam cell formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290: 707-712.

Pavan L, Tarrade A, Hermouet A, Delouis C, Titeux M, Vidaud M, Thérond P, Evain-Brion D, Fournier T. (2003). Human invasive trophoblasts with simian virus 40 provide a new tool to study the role of PPAR $\gamma$  in cell invasion process. *Carcinogenesis* 24: 1325-1336.

Pierce RL, Pierce MR, Liu H, Kadowitz PJ, Miller MJ. (1995). Limb reduction defects after prenatal inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Pediatric Research* 38: 905-911.

Pineda Torra I, Gervois P, Staels B. (1999). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in metabolic disease, inflammation, atherosclerosis and aging. *Current Opinion in Lipidology* 10: 151-159.

Polette M, Nawrocki B, Pintiaux A, Massenat C, Maquoi E, Volders L, Schaaps JP, Birembaut P, Foidart JM. (1994). Expression of gelatinases A and B and their tissue inhibitors by cells of early and term human placenta and gestational endometrium. *Laboratory Investigation* 71: 838-846.

Portha B, Picon L, Rosselin G. (1979). Chemical Diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia* 17: 371-377.

Pukel C, Baquerizo H, Rabinovitch A. (1988). Destruction of rat islet cell monolayers by cytokines. Synergistic interactions of interferon-gamma, tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin 1. *Diabetes* 37 (1): 133-136.

Pustovrh C, Jawerbaum A, Sinner D, Pesaresi M, Baier M, Micone P, Gimeno M, González ET. (2000). Membrane-type matrix metalloproteinase-9 activity in placental tissue from patients with pre-existing and gestational diabetes mellitus. *Reproduction, Fertility and Development* 12: 269-275.

Pustovrh C, Jawerbaum A, Sinner D, White V, Capobianco E, Gonzalez E. (2002). Metalloproteinase 2 activity and modulation in uterus from neonatal streptozotocin-induced diabetic rats during embryo implantation. *Reproduction, Fertility and Development* 14: 479-485.

Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. (1991). Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 288: 481-487.

Radi R, Rodríguez M, Castro L, Telleri R. (1994). Inhibition of mitochondrial electron transport by peroxynitrite. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 308: 89-95.

Ratajiska A, Celutjens JP. (2002). Embryogenesis of the rat heart: The expression of the collagenases. *Basic Research in Cardiology* 97: 189-197.

Rathore N, John S, Kale M, Bhatnagar D. (1998). Lipid peroxidation and antioxidants enzymes in isoproterenol induced oxidative stress in rat tissues. *Pharmacology Research* 38: 297-303.

Redline RW, Chernicky CL, Tan H-Q, Ilan J, Ilan J. (1993). Differential expression of Insulina-like growth factor-II in specific regions of late (post day 9.5) murine. *Molecular Reproduction and Development* 36: 121-129.

Reece EA, Pinter E, Leranath CZ, Garcia-Segura M, Sanyal MK, Hobbins JC, Mahoney MJ, Naftolin F. (1985). Ultrastructural analysis of malformations of the embryonic neural axis induced by in vitro hyperglycemic conditions. *Teratology* 32: 363-373.

Reece EA, Hobbins JC. (1986). Diabetic embryopathy: patogenesis, prenatal diagnosis and prevention. *Obstetrical & Gynecology Survey* 41: 325-335.

Reece EA, Wiznitzer A, Homko CJ, Hagay Z, Wu YK. (1996). Synchronization of the factors critical for diabetic teratogenesis: an in vitro model. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 174: 1284-1288.

Rettori V, Belova N, Dees WL, Nyberg CL, Gimeno M, McCann SM. (1993). Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 10130-10134.

Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. (1998). The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391: 79-82.



Riley SC, Webb CJ, Leask R, McCaig FM, Howe DC. (2000). Involvement of matrix metalloproteinases 2 and 9, tissue inhibitor of metalloproteinases and apoptosis in tissue remodelling in the sheep placenta. *Journal of Reproduction and Fertility* 118: 19-27.

Rinkenberger JL, Werb Z. (2000). The labyrinthine placenta. *Nature Genetics* 25: 248-249.

Robertson CP, Gibbs SM, Roelink H. (2001). cGMP enhances the sonic hedgehog response in neural plate cells. *Developmental Biology* 238: 157-167.

Ryan EA, Enns L. (1988). Role of gestational hormones in the induction of insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 67: 341-347.

Ryu J, Vicencio AG, Yeager ME, Kashgarian M, Haddad GG, Eickelberg O. (2005). Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human and mouse lung development. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 94: 175-183.

Sadler TW, Hunter ES 3rd, Balkan W, Horton WE Jr. (1988). Effects of maternal diabetes on embryogenesis. *American Journal of Perinatology* 5: 319-326.

Salamonsen LA. (1999). Role of proteases in implantation. *Reviews and Reproduction* 4: 11-22.

Sambandam N, Abrahani MA, Craig S, Al-Atar O, Jeon E, Rodrigues B. (2000). Metabolism of VLDL is increased in streptozotocin-induced diabetic rat hearts. *American Journal of Physiology. Heart Circulation Physiology* 278: H1874-1882.

Sato H, Takino T, Okada Y, Cao J, Shinagawa A, Yamamoto E, Seiki M. (1994). A matrix metalloproteinase expressed on the cell surface of invasive tumor cells. *Nature* 370: 61-65.

Schoonjans K, Staels B, Auwers J. (1996). Role of peroxisome proliferator-activated receptor in mediating the effects of the fibrates and fatty acids on genes expression. *Journal of Lipid Research* 37: 907-925.

Shafrir E, Barash V. (1991). Placental glycogen metabolism in diabetic pregnancy. *Israel Journal of Medicine Science* 27 (8-9): 449-61.

Shipley JM, Doley GA, Fliszar CJ, Ye QZ, Johnson LL, Shapiro SD, Welgus HG, Senior RM. (1996). The structural basis for the elastolytic activity of the 92 kDa and 72 kDa gelatinases. Role of the fibronectine type II-like repeats. *Journal of Biological Chemistry* 271: 4335-4341.

Shizukuda Y, Tang S, Yokota R, Ware JA. (1999). Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase C delta activity. *Circulation Research* 85: 247-256.

Shu H, Wong B, Zhou G, Li Y, Berger J, Woods JW, Wright SD and Cai TQ. (2000). Activation of PPARalpha or gamma reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocytic THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 267: 345-349

Signorelli SS, Malaponte G, Libra M, Di Pino L, Celotta G, Bevelacqua V, Petrina M, Nicotra GS, Indelicato M, Navolanic PM, Pennisi G, Mazzarino MC. (2005). Plasma

levels and zymographic activities of matrix metalloproteinases 2 and 9 in type II diabetics with peripheral arterial disease. *Vascular Medicine* 10: 1-6.

Siman CM, Eriksson UJ. (1997). Vitamin E decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes* 46: 1054-1061.

Siman CM, Gittenberger-de Groot A, Wisse B, Eriksson UJ. (2000). Malformations in offspring of diabetic rats: morphometric analysis of neural crest-derived organs and effects of maternal vitamin E treatment. *Teratology* 61: 322-367.

Simian M, Hirai Y, Navre M, Werb Z, Lochter A, Bissell M. (2001). The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development* 128: 3117-3131.

Sinner D, Jawerbaum A, Pustovrh C, White V, Capobianco E, González E. (2002). Levels of endothelin-1 in embryos from control and neonatal streptozotocin-induced diabetic rats, and their relationship with nitric oxide generation. *Reproduction, Fertility & Development* 14: 23-28.

Sivan E, Reece A, Wu Y, Homko C, Polansky M, Borenstein M. (1996). Dietary vitamin E prophylaxis and diabetic embryopathy: morphologic and biochemical analysis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 175: 793-799.

Sivan E, Lee Y, Wu Y, Reece A. (1997). Free radical scavenging enzymes in fetal dysmorphogenesis among offspring of diabetic rats. *Teratology* 56: 343-349.

Soares MJ, Chapman BM, Rasmussen CA, Dai G, Kamei T, Orwig KE. (1996). Differentiation of Trophoblast Endocrine Cells. *Placenta* 17: 277-289.

Solberg H, Rinkenberger J, Dano K, Werb Z, Lund LR. (2003). A functional overlap of plasminogen and MMPs regulates vascularization during placental development. *Development* 130: 4439-4450.

Somerville RPT, Oblander SA; Apte SS. (2003). Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks. *Genome Biology* 4: 216-226.

Srikanta S, Ricker AT, McCulloch DK, Soeldner JS, Eisenbarth GS, Palmer JP. (1986). Autoimmunity to insulin, beta cell dysfunction, and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 35: 139-42.

Stadtman ER, Levine RL. (2003). Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 25: 207-218.

Staskus PW, Masiarz FR, Pallanck LJ, Hawkes SP. (1991). The 21-kDa protein is a transformation-sensitive metalloproteinase inhibitor of chicken fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 266: 449-454.

Steffensen B, Wallon UM, Overall CM. (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 no native type IV collagen. *Journal of Biological Chemistry* 270: 11555-11566.

Sternberger LA, Hardy PH, Cuculis JJ, Meyer HG. (1970). The unlabeled antibody-enzyme method of immunocytochemistry. Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 18: 315-33.

- Sternberger LA (1979). *Immunocytochemistry* (2nd Ed) John Wiley, New York.
- Styrud J, Thunberg L, Nybacka O, Eriksson UJ. (1995). Correlations between maternal metabolism and deranged development in the offspring of normal and diabetic rats. *Pediatric Research* 37: 343-353.
- Suematsu N, Tsutsui H, Wen J, Kang D, Ikeuchi M, Ide T, Hayashidani S, Shiomi T, Kubota T, Hamasaki N, Takeshita A. (2003). Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. *Circulation* 107: 1418-1423.
- Surwit RS, Feinglos MN. (1988). Stress and autonomic nervous system in type II diabetes. A hypothesis. *Diabetes Care* 11: 83-85.
- Sympson CJ, Talhouk RS, Alexander CM, Chin JR, Clift SM, Bissell MJ, Werb Z. (1994). Targeted expression of stromelysin-1 in mammary gland provides evidence for a role of proteinases in branching morphogenesis and the requirement for an intact basement membrane for tissue-specific gene expression. *Journal of Cell Biology* 125: 681-693. Erratum in: *Journal of Cell Biology* (1996) 132(4): following 752.
- Takehara Y, Yoshioka T, Sasaki J. (1990). Changes in the levels of lipoperoxide and antioxidant factors in human placenta during gestation. *Acta Medica Okayama* 44: 103-111.
- Teesalu T, Masson R, Basset P, Blasi F, Talarico D. (1999). Expression of Matrix Metalloproteinases During Murine Chorioallantoic Placenta Maturation. *Developmental Dynamics* 214: 248-258.

Tiboni GM, Giampietro F, Di Giulio C. (2003). The nitric oxide síntesis inhibitor N<sup>ω</sup>-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME) causes limb defects in mouse fetuses: Protective effect of acute hyperoxia. *Pediatric Research* 54: 69-76.

Tiefenbacher CP, Kreuzer J. (2003). Nitric oxide-mediated endothelial dysfunction- is there need to tread? *Current Vascular Pharmacology* 1(2): 123-133.

Turpaev KT. (2002). Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry (Mosc)* 67: 281-292.

Tyagi SC, Meyer L, Kumar S, Schmaltz RA, Reddy HK, Voelker DJ. (1996). Induction of tissue inhibitor of metalloproteinase and its mitogenic response to endothelial cells in human atherosclerotic and restenotic lesions. *The Canadian Journal of Cardiology* 12: 353–362.

Unger RH, Grundy S. (1985). Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetologia* 28: 119-121.

Vadillo-Ortega F, Gonzalez-Avila G, Furth EE, Lei H, Muschel RJ, Stetler-Stevenson WG, Strauss JF 3rd. (1995). 92-kd type IV collagenase (matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases with labor. *American Journal of Pathology* 146: 148-156.

Vadillo-Ortega F, Estrada-Gutierrez G. (2005). Role of matriz metalloproteinases in preterm labour. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynecology* 112: 19-22.

Vagnoni KE, Zheng J, Magness RR. (1998). Matrix metalloproteinases-2 and -9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 of the sheep placenta during the last third of gestation. *Placenta* 19:447-455.

Viana M, Herrera E, Bonet B. (1996). Teratogenic effect of diabetes mellitus in the rat. Prevention by vitamina E. *Diabetologia* 39: 1041-1046.

Viana M, Aruoma OI, Herrera E, Bonet B. (2000). Oxidative damage in pregnant diabetic rats and their embryos. *Free Radical Biology and Medicine* 29: 1115-1121.

Vincent SR, Kimura H. (1992). Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. *Neuroscience* 46: 755-784.

Visse R, Nagase H. (2003). Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. Structure, Function and Biochemistry. *Circulation Research* 92: 827-839.

Wall SJ, Sampson MJ, Levell N, Murphy G. (2003). Elevated matrix metalloproteinase-2 and -3 production from human diabetic dermal fibroblasts. *The British Journal of Dermatology* 149: 13-16.

Walsh SW. (1998). Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 16: 93-104.

Wang Q, Fujii H, Knipp GT. (2002). Expression of PPAR and RXR isoforms in the developing rat and human term placentas. *Placenta* 23: 661-671.

Ward WK, Bolgiano DC, McKnight B, Halter JB, Porte D Jr. (1984). Diminished beta cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Investigation* 74: 1318-1328.

Weksler-Zangen S, Yaffe O, Ornoy A. (2003). Reduced SOD activity and increased neural tube defects in embryos of the sensitive but not of the resistant Cohen diabetic rats cultured under diabetic conditions. *Birth Defects Research (Part A)* 67: 429-437.

Wentzel P, Eriksson UJ. (1998). Antioxidants diminish developmental damage induced by high glucose and cyclooxygenase inhibitors in rat embryos in vitro. *Diabetes* 47: 677-684.

Wentzel P, Eriksson UJ. (2002). 8-Iso-PGF(2alpha) administration generates dysmorphogenesis and increased lipid peroxidation in rat embryos in vitro. *Teratology* 66: 164-168.

West IC. (2000). Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabetic Medicine* 17: 171-180.

White V, Jawerbaum A, Sinner D, Pustovrh C, Capobianco E, González E. (2002). Oxidative stress and altered prostanoid production in the placenta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Reproduction, Fertility and Development* 14: 117-123.

Whiteside EJ, Jackson MM, Herington AC, Edwards DR, Harvey MB. (2001). Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 are key regulators of extracellular matrix degradation by mouse embryos. *Biology of Reproduction* 64: 1331-1337.



Witty JP, Wright JH, Matrisian LM. (1995). Matrix metalloproteinases are expressed during ductal and alveolar mammary morphogenesis, and misregulation of stromelysin-1 in transgenic mice induces unscheduled alveolar development. *Molecular Biology of the Cell* 6: 1287-1303.

Woessner JF Jr, Taplin CJ. (1988). Purification and properties of a small latent matrix metalloproteinase of the rat uterus. *Journal of Biological Chemistry* 263(32): 16918-25.

Woessner JF Jr. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. *The FASEB Journal* 5: 2145-2154.

Worley JR, Baugh MD, Hughes DA, Edwards DR, Hogan A, Sampson MJ, Gavrilovic J. (2003). Metalloproteinase Expression in PMA-stimulated THP-1 Cells. Effects of peroxisome proliferators activated receptor (PPAR) agonists and 9-cis-retinoic acid. *Journal of Biological Chemistry* 278: 51340-51346.

Xia Y, Roman LJ, Masters BS, Zweier JL. (1998). Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *Journal of Biological Chemistry* 273: 22635-22639.

Zonana J, Rimoin DL. (1976). Inheritance of diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine* 295: 603-605.