

Trabajos Originales

PREMIO PROF. DR. ABRAHAM GUITELMAN

LIGANDOS DE RECEPTORES ACTIVADOS POR FACTORES DE PROLIFERACIÓN PEROXISOMAL (PPARs) MODULAN EL METABOLISMO LIPÍDICO EN EL TEJIDO PLACENTARIO SANO Y DIABÉTICO.

*A. Jawerbaum**, E. Capobianco, N. Martínez, V. White, M.C. Pustovrh, R. Higa, E. González.
Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, CEFYBO-CONICETUBA.

**Dra Alicia Jawerbaum. Subdirectora del Laboratorio de Reproducción y Metabolismo, CEFYBO-CONICET. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires. Paraguay 2155, Piso 17, 1121, Buenos Aires, Argentina. email: a.jawerbaum@abaconet.com.ar*

RESUMEN

Con el objeto de evaluar si agonistas de PPARs modulan el metabolismo de lípidos en la placenta de rata control (C) y diabética (D, por administración de estreptozotocina neonatal 90 mg/kg) se explantó tejido placentario en el día 13.5 de preñez e incubó con o sin agonistas de PPARs: clofibrato (agonista de PPARalfa 20 μ M), 15deoxydelta^{12,14} prostaglandina J₂ (agonista de PPARgamma, 2 μ M), y carbaprostaciclina (agonista de PPARdelta, 1 μ M). Se evaluaron niveles de triglicéridos (TG), colesterol (COL), ésteres de colesterol (ECOL) y fosfolípidos (PL); la síntesis lipídica *de novo* por incorporación de ¹⁴C-acetato y la liberación de glicerol como índice del catabolismo lipídico. En D se evidenció un incremento en los niveles de TG (p<0.05) y ECOL (p<0.01), una reducción de la síntesis lipídica *de novo* (p<0.05) y un incremento del catabolismo lipídico (p<0.001) en relación a C. La activación de PPARalfa produjo en ambos grupos reducción de los niveles

(p<0.05) e incremento de la síntesis *de novo* (p<0.05) y del catabolismo de lípidos (p<0.01). El agonista de PPARgamma no modificó los niveles ni el catabolismo de lípidos placentarios, pero redujo la síntesis lipídica *de novo* (p<0.05). El agonista de PPARdelta redujo los niveles de PL (p<0.05) y la síntesis lipídica *de novo* (p<0.05) e incrementó el catabolismo lipídico placentario (p<0.01). Estos resultados evidencian novedosas funciones de los PPARs sobre el metabolismo de lípidos placentarios que podrían ser de interés en la regulación de las anomalías inducidas por la diabetes materna.

INTRODUCCIÓN

La placenta es un órgano complejo, esencial para el transporte materno-fetal de nutrientes y oxígeno. Dada su importancia, la presencia de anomalías en el desarrollo, estructura y/o función de la placenta dará lugar a consecuencias adversas en el desarrollo fetal. En la patología diabética el

daño placentario se considera responsable, al menos parcialmente, de la alta incidencia de complicaciones fetales resultantes de dicha patología (1).

Durante la gestación diabética, las alteraciones del metabolismo materno, no sólo de hidratos de carbono sino también de lípidos, condicionarán la anómala transferencia de metabolitos al feto en desarrollo (2). Mayoritariamente, los lípidos son transportados a través de la placenta de manera indirecta. En forma inicial los lípidos provenientes del plasma materno son incorporados a la placenta, que posee receptores para lipoproteínas; posteriormente son catabolizados mediante la acción de lipasas, para luego ser re-esterificados y acumulados en forma transitoria en este tejido. Para la transferencia al feto, los ácidos grasos son liberados de los lípidos placentarios mediante su re-catabolización (3). De esta forma, la disponibilidad de ácidos grasos no esterificados a ser transferidos hacia el feto está finamente regulada en el tejido placentario, permitiéndose, una vez liberados, el pasaje de dichos ácidos grasos a través del sinciotrofoblasto, tanto por difusión simple como facilitada por la presencia de proteínas de unión de ácidos grasos (4).

En la diabetes, y de acuerdo al grado de control metabólico de la enfermedad, se observa cómo los mayores niveles lipídicos presentes en suero materno condicionan una acumulación de lípidos a nivel placentario y un mayor transporte al feto, donde existe una sobreacumulación grasa vinculada con la placentomegalia y la macrosomía fetal (5). Estas alteraciones en el crecimiento intrauterino inducen no sólo complicaciones en el parto y en el propio neonato, sino que, además, se vinculan con cambios en la programación intrauterina del desarrollo fetal, que se verán reflejados en la mayor incidencia de patologías como la obesidad y la diabetes tipo 2 en la vida adulta de la descendencia (6;7). De estos antecedentes surge el interés en el estudio de los mecanismos que pudieran estar involucrados con la regulación del metabolismo lipídico placentario, relacionada en forma directa con la transferencia de lípidos al feto en desarrollo.

Los receptores activados por factores de peroxidación peroxisomal (PPARs) son factores de transcripción activados por ligandos involucrados en la diferenciación de adipocitos y en la regulación de la homeostasis lipídica (8). Existen tres subtipos de PPARs: PPARalfa, PPARgamma y PPARdelta. Los mismos heterodimerizan con el receptor nuclear del ácido 9-cis-retinoico (RXR), formando complejos que interactúan con elementos de respuesta específicos en el ADN, localizados

en la región promotora de sus genes "blanco". La activación de estos receptores por parte de sus ligandos específicos media el reclutamiento de factores coactivadores y la consecuente transcripción de genes de importancia en el control del metabolismo de lípidos y carbohidratos, de procesos inflamatorios y del desarrollo fetal (9;10).

Los agonistas endógenos de los PPARs son prostaglandinas, leucotrienos y ácidos grasos poliinsaturados. Las glitazonas y los fibratos son agonistas farmacológicos de estos receptores, y poseen claros efectos reguladores del metabolismo de hidratos de carbono y de lípidos, así como también de los mecanismos desencadenantes de la inflamación. Estos fármacos son utilizados en el tratamiento de la obesidad, las dislipemias y la diabetes (11). Dada la importancia de los PPARs en la regulación del metabolismo lipídico y su capacidad de mejorar parámetros vinculados con dicha homeostasis en pacientes diabéticos, surge como hipótesis la posibilidad de que los PPARs regulen el metabolismo lipídico placentario. El estudio de estos mecanismos permitiría mejorar la comprensión de posibles vías que permitan en un futuro prevenir las alteraciones en el balance de los lípidos placentarios inducidas en la gestación diabética.

Los PPARs han sido localizados y estudiados en tejido placentario, debido a la función esencial de PPARgamma y PPARdelta en el desarrollo de este órgano. En efecto, la inactivación de los correspondientes genes en roedores induce letalidad fetal, producto de severas anomalías estructurales en la zona del laberinto placentario y en su vasculatura, que lleva a la muerte fetal a mediados de la gestación, cuando la placenta comienza a ser esencial para el transporte de nutrientes y oxígeno provenientes de la circulación materna, el cual resulta ser altamente eficiente en condiciones fisiológicas (12;13).

Debido a la posible importancia de los PPARs como mediadores de funciones metabólicas placentarias durante el desarrollo fetal, este estudio se ha realizado a mediados de la gestación, y se ha empleado a la rata diabética como modelo experimental. La diabetes se ha inducido mediante la administración neonatal de estreptozotocina (14), modelo que ha sido ampliamente caracterizado por nuestro grupo de trabajo durante la preñez, y en el cual las glucemias (entre 150 y 230 mg/dl) coinciden con aquellas que frecuentemente se observan en la mujer diabética gestante.

Dados los antecedentes mencionados, el presente estudio tiene por objeto evaluar la acción de agonistas de los diferentes subtipos de PPARs

como reguladores de los niveles, la síntesis y el catabolismo de lípidos en la placenta de rata sana y diabética a mediados de la gestación.

METODOLOGÍA

Modelo experimental

Ratas en período neonatal (día 2 de nacimiento) fueron inyectadas en forma subcutánea con 90 mg/kg de estreptozotocina disuelta en buffer citrato, según la técnica descrita por Portha y col. (14). El estado diabético fue confirmado en los animales adultos mediante curvas de tolerancia a la glucosa (15). Un grupo de ratas sanas fueron inyectadas con buffer citrato para ser utilizadas como control experimental. Ratas sanas y diabéticas fueron apareadas con machos sanos, designándose el día de detección de espermatozoides en el extendido vaginal como día 0.5 de preñez. Los animales fueron sacrificados en el día 13.5 de gestación, y las placentas fueron removidas y preparadas según se detalla a continuación. Para evaluar los niveles de glucemia en la sangre materna y en el líquido amniótico se utilizaron tiras reactivas comerciales.

Preparaciones placentarias

El tejido placentario fue conservado a -70°C para la posterior evaluación de los niveles basales de lípidos o incubado durante tres horas en baño metabólico bajo atmósfera controlada (CO_2 : 5%; O_2 : 95%) a 37°C , en medio Krebs Ringer Bicarbonato (KRB) con o sin el agregado de agonistas de PPARs (PPARalfa: clofibrato 20 μM , PPARgamma: 15deoxydelta 12,14 Prostaglandina $_2$ (15dPGJ $_2$) 2 μM , y PPARdelta: carbaprostaciclina (cPGI $_2$) 1 μM). Finalizada la incubación, el medio de cultivo se conservó a -20°C para determinar los niveles de glicerol, y el tejido a -70°C para la posterior cuantificación de los niveles de lípidos, tal como se detalla a continuación. Otros explantes fueron incubados en forma similar, pero con el agregado de ^{14}C -acetato (1.6 μCi , actividad específica 53 mCi/mmol) al medio de incubación, a fin de evaluar la síntesis *de novo* lipídica, conservándose el tejido a -70°C hasta realizar dicha evaluación.

Determinación de los niveles de lípidos placentarios

Los lípidos placentarios fueron extraídos utilizando metanol:cloroformo 2:1 como solventes de extracción. Las distintas especies lipídicas se separaron mediante cromatografía en capa delgada, en la cual se sembraron tanto las muestras como una curva estándar conteniendo cantidades

conocidas de las distintas especies lipídicas a analizar. Las placas se desarrollaron utilizando como solvente una mezcla de hexano: éter: ácido acético 80:20:2 v/v/v, para luego revelar la presencia de lípidos con vapores de yodo. Finalmente se digitalizó la imagen por medio de un escáner y se procedió a la cuantificación de la intensidad y el área de las zonas coloreadas mediante el programa Sigmagel. Los valores obtenidos se extrapolaron de la curva estándar. Los resultados se expresaron como microgramos de lípidos por mg de proteínas placentarias.

Determinación de la síntesis *de novo* de lípidos placentarios

Los lípidos incubados con el trazador radioactivo ^{14}C -acetato fueron extraídos en la forma ya descrita para lípidos fríos. Previamente al sembrado, se separó una alícuota para la cuantificación de la radioactividad total incorporada a la masa lipídica. Se sembraron las muestras, se desarrollaron y se revelaron las placas de la manera mencionada previamente. Las zonas ocupadas por los lípidos radioactivos fueron recuperadas por raspado de la placa y recolección de la sílica en viales apropiados conteniendo líquido de centelleo para la posterior cuantificación de radioactividad en un contador de centelleo líquido. Los resultados fueron expresados como dpm por microgramos de proteínas placentarias.

Determinación del catabolismo lipídico placentario

Se determinaron los niveles de glicerol (producto de hidrólisis de triglicéridos y fosfolípidos) liberados al medio de incubación por los explantes placentarios, índice de catabolismo de lípidos esterificados en dicho tejido. El método empleado se fundamenta en la modificación enzimática del glicerol para producir fosfato de dihidroxiacetona, proceso en el cual se genera NADH, producto que se cuantifica mediante espectrofotometría UV. La reacción se amplifica mediante el agregado de hidracina, que captura al fosfato de di-hidroxiacetona, favoreciendo la reacción enzimática (16;17). La composición del reactivo de trabajo empleado fue: glicina 1.5%, MgCl_2 0.04%, ATP 0.075%, NAD 0.036% (p/v), 20 unidades de gliceroquinasa y 200 unidades de gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa. Finalizada la reacción, se determinó la absorbancia a 340 nm. La concentración de glicerol se extrapoló de curva estándar. Se expresaron los resultados como nmoles de glicerol por mg de proteínas placentarias.

RESULTADOS

Características del modelo animal y del tejido placentario

Las ratas diabéticas obtenidas por administración neonatal de estreptozotocina muestran elevadas glucemias en relación al control ($p < 0.001$) (TABLA 1), nivel de hiperglucemia que se considera moderado en relación a otros modelos de diabetes y que es compatible con la gestación a término. En el día 13.5 de gestación, la hiperglucemia se detecta también en el líquido amniótico ($p < 0.001$). En este modelo se observa un incremento en la reabsorción embrionaria (evaluada mediante la relación entre el número de embriones presentes y el número de sitios de implantación) y un aumento en el índice de malformaciones embrionarias ($p < 0.01$). En esta etapa no se encuentra alterado el peso placentario y fetal en la rata diabética en relación al control (TABLA 1).

Efecto de la activación de PPARs sobre los niveles de lípidos placentarios

Con el objeto de determinar si la activación de PPARs modula los niveles de lípidos en el tejido placentario de rata sana, explantes placentarios fueron incubados en presencia o ausencia de agonistas de PPARs, procediéndose luego a la determinación de los niveles placentarios de triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol. Observamos que los diferentes lípidos placentarios evaluados se modifican en forma diferencial al activar cada uno de los tres isotipos de PPARs. La activación de PPARalfa mediante su agonista clofibrato (20 μM) induce una reducción en los niveles de triglicéridos (43%, $p < 0.01$), fosfolípidos (63% $p < 0.01$) y ésteres de colesterol (46% $p < 0.05$), sin modificar los niveles de colesterol (FIGURA 1). En forma diferente, la activación de PPARgamma mediante la acción de su agonista endógeno 15dPGJ₂ (2 μM) no modifica los niveles de las especies lipídicas evaluadas (FIGURA 1). La activación de PPARdelta mediante su agonista carbaprostaciclina (1 μM) induce una disminución en los niveles placentarios de fosfolípidos (51%, $p < 0.05$) sin modificar los niveles de las otras especies lipídicas estudiadas (FIGURA 1).

Al comparar los niveles de lípidos en tejido placentario de rata sana con los hallados en animales diabéticos, se detecta la presencia de anomalías en la composición lipídica del tejido diabético (FIGURA 2). Se observa un incremento en los niveles de triglicéridos (50%, $p < 0.05$) y de ésteres de colesterol (93%, $p < 0.01$), no detectándose ano-

malías en los niveles de fosfolípidos y de colesterol al comparar la placenta de animal sano y diabético (FIGURA 2).

Al determinar el efecto de agonistas de PPARs en la placenta de rata diabética, observamos efectos semejantes a aquéllos observados en el tejido sano (FIGURA 3). En efecto, la adición de clofibrato 20 μM , activador de PPARalfa, induce una disminución en los niveles placentarios de triglicéridos (48%, $p < 0.02$), fosfolípidos (41%, $p < 0.05$), colesterol (24%, $p < 0.05$) y ésteres de colesterol (44%, $p < 0.02$) en el tejido diabético. Al igual que en la placenta sana, la adición de 15dPGJ₂ 2 μM (agonista de PPARgamma) no modificó los niveles de las especies lipídicas estudiadas (FIGURA 3). Asimismo, en los tejidos de animales diabéticos también observamos que carbaprostaciclina 1 μM (agonista de PPARdelta) disminuye los niveles de fosfolípidos (30%, $p < 0.05$) y de colesterol (35%, $p < 0.05$), sin alterar los niveles de triglicéridos y de ésteres de colesterol (FIGURA 3).

• *Los resultados obtenidos evidencian anomalías en los niveles lipídicos en la placenta de animales diabéticos y muestran que mediante la activación de los receptores nucleares PPARs se regulan los niveles de lípidos placentarios.*

• *Con el objeto de dilucidar las vías metabólicas involucradas en dicho mecanismo regulatorio, se evaluó el efecto de agonistas de PPARs sobre la síntesis de novo de lípidos y sobre el catabolismo lipídico en la placenta.*

Efecto de la activación de PPARs sobre la síntesis de novo de lípidos placentarios

Para evaluar la síntesis *de novo* de lípidos placentarios se utilizó ¹⁴C-acetato como trazador. Los explantes placentarios fueron incubados durante 3 horas en medio KRB conteniendo el mencionado trazador radioactivo, y en presencia o ausencia de agonistas de PPARs. Se procedió luego a la determinación de la incorporación del trazador a las distintas fracciones lipídicas estudiadas: triglicéridos, fosfolípidos, colesterol y ésteres de colesterol.

Al realizar estos estudios en la placenta de rata sana observamos (FIGURA 4) que la adición de clofibrato 20 μM (agonista de PPARalfa) induce un incremento significativo en la síntesis *de novo* de colesterol (103%, $p < 0.01$) y de ésteres de colesterol (80%, $p < 0.01$), no modificándose en

	Ratas Controles	Ratas Diabéticas
Glucemia materna (mg/dl)	97 ± 10	198 ± 21***
Niveles de glucosa en el líquido amniótico (mg/dl)	50 ± 8	145 ± 33***
Tasa de reabsorción embrionaria (%)	1	11.5**
Tasa de malformaciones embrionarias (%)	1	10**
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

TABLA 1: Características del modelo experimental. Los datos representan el promedio ± error estándar. n=10 ratas en cada grupo experimental. **p<0.01, ***p<0.001.

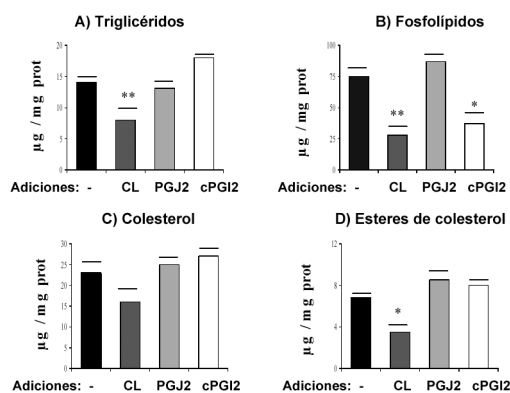


FIGURA 1: Niveles de lípidos en la placenta de rata sana: Efecto de agonistas de PPARs. Los explantes placentarios fueron incubados durante 3 horas en medio KRB con o sin adiciones de clofibrato (CL, 20 μM), 15dPGJ2 (PGJ2, 2 μM) o carbaprostaciclina (cPGI2, 1 μM). Los datos representan el promedio ± error estándar. n=8 en cada grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01.

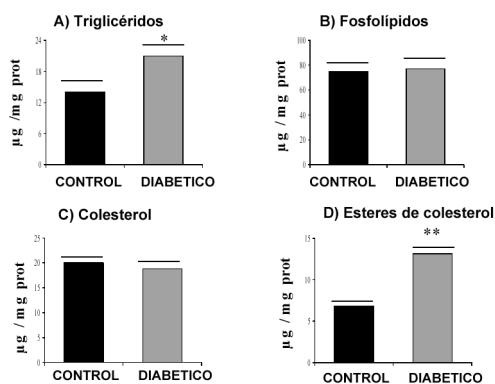


FIGURA 2: Niveles de lípidos en la placenta de rata sana y diabética. Los datos representan el promedio± error estándar. n=8 en cada grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01.

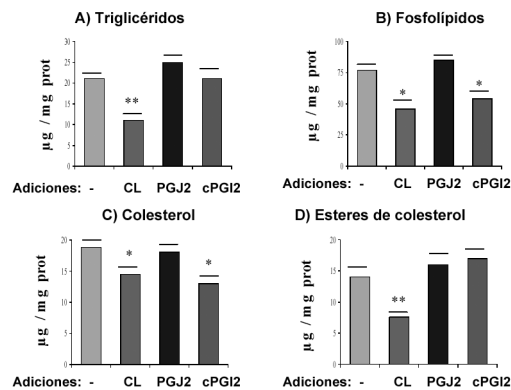


FIGURA 3: Niveles de lípidos en la placenta de rata diabética: Efecto de agonistas de PPARs. Los explantes placentarios fueron incubados por 3 horas en medio KRB con o sin adiciones de clofibrato (CL, 20 mM), 15dPGJ2 (PGJ2, 2 μ M) o carbaprostacilina (cPGI2, 1 μ M). Los datos representan el promedio \pm error estándar. n=8 en cada grupo experimental. *p<0.05, **p<0.02.

forma significativa la síntesis de triglicéridos y de fosfolípidos. En forma opuesta, la activación de PPARgamma a través de la acción de 15dPGJ₂ (2 μ M) induce una disminución en la síntesis *de novo* de todos los lípidos placentarios evaluados (triglicéridos 57%, p<0.05; fosfolípidos 75%, p<0.05; colesterol 74% p<0.01 y ésteres de colesterol 65%, p<0.01) (FIGURA 4). Por último, observamos que en presencia de carbaprostacilina (1 μ M) se produce una reducción en la síntesis *de novo* de triglicéridos (40%, p<0.05) y de fosfolípidos (39%, p<0.05), sin modificarse la síntesis *de novo* de colesterol y ésteres de colesterol.

Al comparar la síntesis *de novo* de lípidos en tejido placentario de rata sana y diabética, se observa una clara disminución en la síntesis de todas las especies lipídicas estudiadas: triglicéridos (84%, p<0.01); fosfolípidos (71%, p<0.05), colesterol (54%, p<0.05) y ésteres de colesterol (87%, p<0.001) (FIGURA 5).

Al determinar la acción de agonistas de PPARs sobre la síntesis *de novo* lipídica (utilizando ¹⁴C-acetato como trazador) en la placenta de rata diabética, observamos efectos semejantes e incluso mayores a los evidenciados en el tejido sano (FIGURA 6). En efecto, en la placenta diabética la adición de clofibrato 20 μ M (activador de PPARalfa) induce un importante incremento en la síntesis *de novo* de todas las especies lipídicas evaluadas (triglicéridos 150%, p<0.01; fosfolípidos 166%, p<0.05; colesterol 138%, p<0.01 y ésteres de colesterol 888%, p<0.01). Asimismo, al activar PPARgamma mediante la adición de 15dPGJ₂ (2 μ M) se observa una disminución en la síntesis *de novo* de triglicéridos (58%, p<0.05), de fosfolípidos (58%, p<0.01) y de colesterol (80%, p<0.01), no encontrándose modificada la síntesis de ésteres de colesterol (FIGURA 6). En cuanto a la

acción de agonistas de PPARdelta, observamos que la adición de carbaprostacilina 1 μ M también produce una reducción en la síntesis de triglicéridos (58%, p<0.05), fosfolípidos (51%, p<0.05) y colesterol (74%, p<0.05), sin modificaciones en la síntesis de ésteres de colesterol (FIGURA 6).

• **Los resultados obtenidos evidencian una menor síntesis lipídica en la placenta de ratas diabéticas. Asimismo se ha determinado que los agonistas de PPARs poseen importantes efectos regulatorios sobre la síntesis *de novo* de lípidos placentarios, diferentes para la activación de cada uno de los PPARs.**

Efecto de la activación de PPARs sobre el catabolismo lipídico placentario

Con el objeto de evaluar un posible efecto de la activación de PPARs sobre el catabolismo de lípidos esterificados en la placenta, explantes placentarios fueron incubados durante 3 horas en medio KRB en presencia o ausencia de activadores de PPARs, para luego determinar los niveles de glicerol liberados al medio de cultivo.

En los animales sanos observamos (FIGURA 7) que la adición de clofibrato 20 μ M (agonista de PPARalfa) induce un importante incremento del catabolismo lipídico placentario (133%, p<0.01). No se observan modificaciones en este parámetro en presencia de 15dPGJ₂ 2 μ M (agonista de PPARgamma). Sin embargo, el incremento del catabolismo placentario que se observa al activar el receptor PPARdelta mediante la adición de su agonista carbaprostacilina 1 μ M es muy significativo (224%, p<0.001) (FIGURA 7).

Al comparar el catabolismo de lípidos esterificados en tejido placentario de rata sana y diabética, este parámetro muestra un perfil anómalo en el tejido diabético. En efecto, se observa

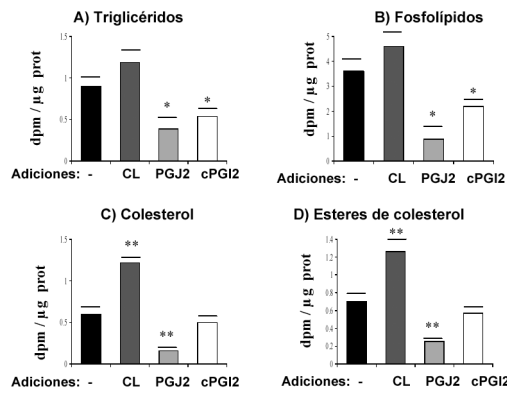


FIGURA 4: Síntesis de novo de lípidos en la placenta de rata sana: Efecto de agonistas de PPARs. Los explantes placentarios fueron incubados durante 3 horas en medio KRB conteniendo ¹⁴C-acetato, con o sin adiciones de clofibrato (CL, 20 µM), 15dPGJ2 (PGJ2, 2 µM) o carbaprostacilina (cPGI2, 1 µM). Los datos representan el promedio ± error estándar. n=8 en cada grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01.

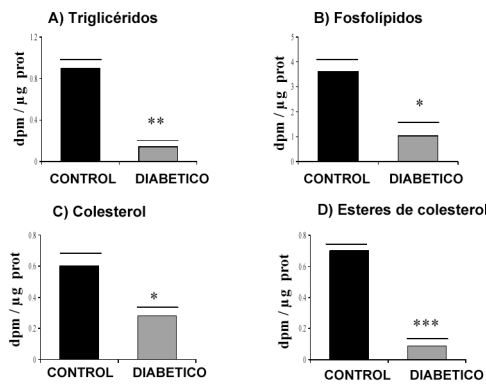


FIGURA 5: Síntesis de novo de lípidos en la placenta de rata sana y diabética. Los datos representan el promedio ± error estándar. n=8 en cada grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

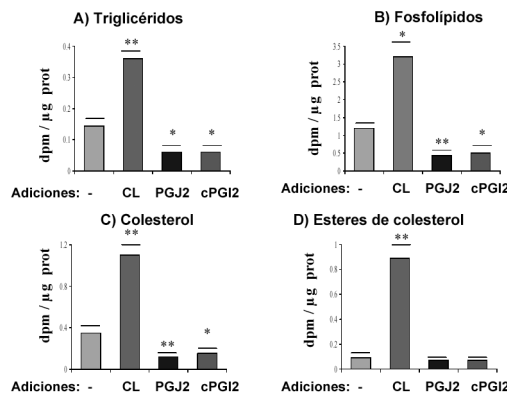


FIGURA 6: Síntesis de novo de lípidos en la placenta de rata diabética: Efecto de agonistas de PPARs. Los explantes placentarios fueron incubados durante 3 horas en medio KRB conteniendo ¹⁴C-acetato, con o sin adiciones de clofibrato (CL, 20 µM), 15dPGJ2 (PGJ2, 2 µM) o carbaprostacilina (cPGI2, 1 µM). Los datos representan el promedio ± error estándar. n=8 en cada grupo experimental. *p<0.05, **p<0.01.

un importante incremento del catabolismo lipídico en el tejido placentario de ratas diabéticas en relación al control (99%, $p < 0.001$), (FIGURA 8).

Al determinar la acción de agonistas de PPARs sobre el catabolismo de lípidos esterificados en la placenta de rata diabética, observamos (FIGURA 9) que en este tejido la activación de PPARalfa mediante la adición de clofibrato 20 μM no modifica el catabolismo de lípidos placentarios. En forma semejante a lo observado en el tejido sano, la adición de 15dPGJ₂ 2 μM (agonista de PPARgamma) tampoco modifica el catabolismo de lípidos placentarios, mientras que la activación de PPARdelta a través del agregado de carbaprostaciclina 1 μM estimula dicho catabolismo, efecto evidenciado por el incremento en la liberación de glicerol al medio de cultivo (53%, $p < 0.01$) (FIGURA 9).

• Los resultados obtenidos evidencian que el catabolismo de lípidos placentarios es mayor en la placenta de animales diabéticos en relación al control. Asimismo se ha determinado la capacidad de PPARalfa y PPARdelta de incrementar el catabolismo lipídico placentario.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo evidencian por primera vez la importancia de los tres isotipos de PPARs en la regulación del metabolismo lipídico placentario. En la placenta se regula en forma activa la acumulación de lípidos y su transporte a la circulación fetal, a través de sus múltiples vías metabólicas, proteínas transportadoras y receptores de membrana, citoplasmáticos y nucleares. De esta forma se asegura la adecuada cantidad y calidad de lípidos a ser transferidos al feto en desarrollo (18).

La patología diabética impacta sobre el metabolismo de lípidos placentarios a causa de las alteraciones presentes en el perfil lipídico del plasma materno. Asimismo debemos tener en cuenta el daño de tipo proinflamatorio y oxidativo que se evidencia en este tejido, y que también condicionará negativamente su desarrollo, función y metabolismo (19;20).

En el modelo experimental de diabetes utilizado, las hiperglucemias son moderadas, y se acompañan de elevadas concentraciones de glucosa en el líquido amniótico y de un incremento en los índices de malformación y de reabsorción embrionaria, que probablemente hayan sido inducidos en el período de organogénesis temprana, tal como se reportó previamente (21). Si bien en esta etapa de la gestación aún no se detectan incremen-

tos en el peso placentario, estudios anteriores realizados en la preñez a término muestran incrementos en el peso de este órgano (22). Los resultados del presente trabajo muestran que ante glucemias moderadamente elevadas, el metabolismo lipídico placentario se encuentra sumamente afectado, observándose no sólo incrementos en los niveles de lípidos en el tejido diabético, sino también un elevado catabolismo lipídico y una menor síntesis de lípidos. La disminución de la síntesis *de novo* parece evidenciar un mecanismo compensatorio ante la elevada oferta de lípidos maternos circulantes. Este dato, sumado al incremento del índice catabólico, sugiere la posibilidad de que el órgano esté limitando la acumulación placentaria de lípidos, mecanismo necesario para evitar la lipotoxicidad celular, pero con probables consecuencias adversas para el feto en desarrollo, emergentes del consecuente incremento en la transferencia de ácidos grasos. En efecto, estudios realizados tanto en humanos como en modelos experimentales de diabetes, muestran la directa relación existente entre la sobreacumulación de lípidos en la placenta y los altos índices lipídicos fetales (18;23).

En el presente estudio hemos evaluado al tejido placentario a mediados de la gestación en la rata, período en el cual el órgano posee activas todas las funciones de oxigenación y transporte de nutrientes, y en el cual es elevada la expresión de PPARs, principalmente en las células trofoblásticas (24) (10). Hasta el momento, se había descrito que la activación de los PPARs era capaz de incrementar la proliferación y la capacidad invasiva trofoblástica, de fundamental importancia en el evento de implantación y desarrollo de la placenta (25). Resultados previos de nuestro laboratorio mostraron asimismo la acción de PPARs sobre la producción placentaria de óxido nítrico, potente dilatador de la vasculatura placentaria (26). En este trabajo se muestra la relevancia de PPARs como moduladores del metabolismo de lípidos en la placenta, de importancia en la transferencia de lípidos hacia el feto en desarrollo.

Los resultados obtenidos muestran que la activación de los distintos PPARs cumple roles diferentes e importantes en la regulación del metabolismo lipídico en la placenta. La activación de PPARalfa da lugar a una disminución en los niveles de lípidos, probablemente a consecuencia de su claro efecto catabólico. Se observa sin embargo que la activación de estos receptores también estimula la síntesis *de novo* lipídica en este tejido, mecanismo que probablemente tienda a contrarrestar su potente acción catabólica. Es conocida la capacidad lipolítica emergente de la activación de

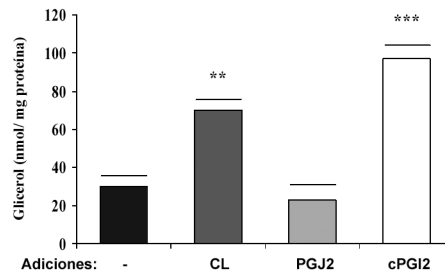


FIGURA 7: Catabolismo lipídico en la placenta de rata sana: Efecto de agonistas de PPARs. Los explantes placentarios fueron incubados durante 3 horas en medio KRB con o sin adiciones de clofibrato (CL, 20 μ M), 15dPGJ2 (PGJ2, 2 μ M) o carbaprostaciclina (cPGI2, 1 μ M), para luego cuantificar los niveles de glicerol en el medio de incubación. Los datos representan el promedio \pm error estándar. n=8 en cada grupo experimental. **p<0.01, ***p<0.001.

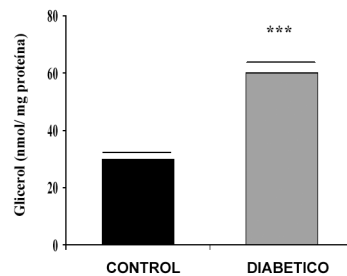


FIGURA 8: Catabolismo lipídico en la placenta de rata sana y diabética. Los explantes placentarios fueron incubados durante 3 horas en medio KRB para luego evaluar los niveles de glicerol en el medio de incubación. Los datos representan el promedio \pm error estándar. n=10 en cada grupo experimental. ***p<0.001.

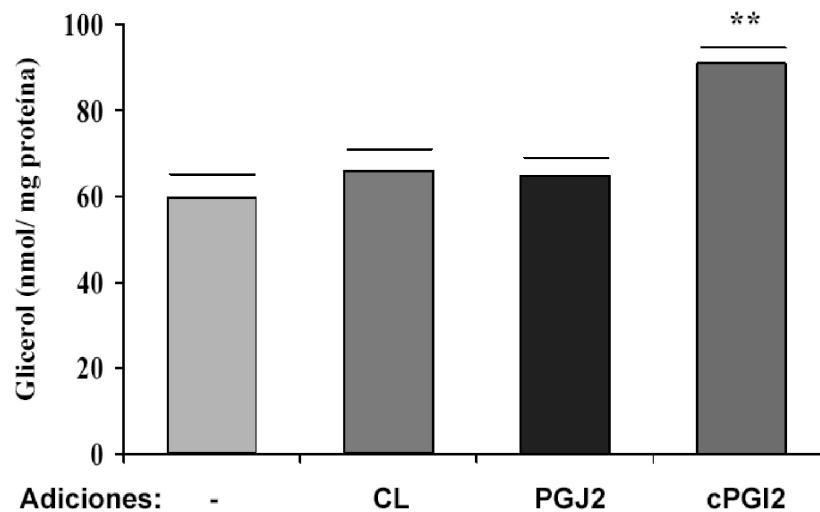


FIGURA 9: Catabolismo lipídico en la placenta de rata diabética: Efecto de agonistas de PPARs. Los explantes placentarios fueron incubados durante 3 horas en medio KRB con o sin adiciones de clofibrato (CL, 20 μ M), 15dPGJ2 (PGJ2, 2 μ M) o carbaprostaciclina (cPGI2, 1 μ M), para luego cuantificar los niveles de glicerol en el medio de incubación. Los datos representan el promedio \pm error estándar. n=8 en cada grupo experimental. **p<0.01.

PPARalfa en otros tejidos (27), habiéndose descrito una significativa disminución de los niveles de lípidos circulantes en pacientes dislipémicos, con y sin diabetes, que han sido medicados con sus agonistas farmacológicos (28;29).

Al igual que en el tejido sano, en la placenta diabética PPARalfa reduce los niveles de lípidos placentarios, e incrementa la síntesis *de novo* lipídica. El agonista de PPARalfa no produce un incremento en la liberación de glicerol en el tejido diabético, diferencia en relación al tejido sano que podría deberse a una neo-esterificación de dicho compuesto, ya que la activación de PPARalfa produce un aumento notable en la síntesis de fosfolípidos y triglicéridos. Cabe destacar que la activación de este receptor podría entonces mejorar las anomalías observadas en el tejido diabético, reduciendo sus elevados niveles de lípidos e incrementado su baja síntesis *de novo*. Asimismo, será fundamental estudiar el impacto de esta activación a nivel fetal.

En cuanto a la función de PPARgamma, este receptor nuclear dirige la diferenciación de adipocitos y la formación del tejido adiposo (30). Además, es de importancia su función antiinflamatoria en procesos arterioescleróticos, ya que regula la captación de LDL oxidado por parte de las células espumosas (macrófagos) (31). Como ya se ha mencionado, la presencia de PPARgamma es esencial en el desarrollo placentario, y su inactivación origina importantes alteraciones morfológicas, principalmente en la zona del laberinto, que impiden su función y conllevan a la letalidad fetal (12). Asimismo, se vincula a este receptor nuclear con la regulación de la capacidad invasiva del trofoblasto (25) (32). Nuestros resultados muestran que la activación de PPARgamma modula el metabolismo lipídico en forma distinta a la de PPARalfa o PPARdelta. Dicha activación no modifica la masa ni el catabolismo lipídico, y produce una disminución de la síntesis *de novo* de lípidos placentarios, parámetro que se encuentra reducido en el tejido diabético, pero que se reduce aún más en presencia de agonistas de este receptor nuclear. Estudios realizados en cultivos de trofoblastos muestran que la activación de PPARgamma incrementa la incorporación de ácidos grasos a estas células (33). La disminución en la síntesis *de novo* de lípidos que hemos observado en presencia del agonista de este receptor podría ser la respuesta compensatoria a un incremento en la oferta de ácidos grasos incorporados a las células trofoblásticas.

En cuanto a PPARdelta, si bien este isotipo ha sido menos estudiado que los otros, se ha observado que su activación da lugar a efectos

catabólicos en el tejido adiposo y en los macrófagos (34;35). En la placenta, su inactivación resulta, al igual que PPARgamma, en letalidad embrionaria producto de alteraciones de desarrollo placentario (13). En cuanto al metabolismo lipídico placentario, nuestros resultados muestran que su activación induce una reducción en los niveles de fosfolípidos placentarios, efecto que parece deberse a una importante estimulación del catabolismo de lípidos en este tejido, y que se acompaña de una reducción en la síntesis lipídica *de novo*. De esta forma, se sugiere que la activación de este receptor tiende a incrementar el catabolismo de fosfolípidos y su posible transferencia al feto en desarrollo, donde son requeridos en elevadas concentraciones. Estos efectos de prostaciclina, agonista de PPARdelta, se evidencian también en el tejido placentario de rata diabética, donde nuestros resultados preliminares (no mostrados) demuestran la existencia de altos niveles de fosfolípidos fetales a mediados de la gesta.

• De estos estudios podemos concluir que los PPARs son importantes moduladores del metabolismo lipídico placentario. La activación de cada uno de los isotipos de este receptor conlleva a efectos específicos, claramente vinculados con la regulación de ciertos aspectos del metabolismo de lípidos en la placenta.

• En este trabajo se han utilizado agonistas de PPARs farmacológicos o endógenos específicos, y será objeto de nuestros futuros estudios, la evaluación de la acción de modificaciones dietarias con ácidos grasos poliinsaturados, activadores de PPARs, que podrían ser administrados durante la gestación humana.

• Dados los profundos desbalances del metabolismo lipídico que se observan en la placenta diabética, y habiéndose evidenciado la capacidad reguladora de PPARs sobre dicho metabolismo en este tejido, los resultados obtenidos abren un camino hacia futuros estudios que evalúen la posibilidad terapéutica de moduladores de estos receptores nucleares, regulando el propio metabolismo de lípidos placentarios y su transferencia al feto, con el objeto de evitar las dislipemias vinculadas al desarrollo de la unidad fetoplacentaria en la gestante diabética.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue subsidiado por ANPCYT (PICT 05-10652) y CONICET (PIP 5397/05 y PIP 5317/05).

REFERENCIAS

1. Persson B, Geutz J, Lunell N. Diabetes in pregnancy. In *Reviews in Perinatal Medicine*. Scorpelli EM CE, Ed. New York, Raven Press, 1983, p. 1
2. Shafrir E, Khassis S. Maternal-fetal fat transport versus new fat synthesis in the pregnant diabetic rat. *Diabetologia* 1982;22:111-7
3. Haggarty P. Placental regulation of fatty acid delivery and its effect on fetal growth—a review. *Placenta* 2002;23 Suppl A:S28-38
4. Dutta-Roy AK. Transport mechanisms for long-chain polyunsaturated fatty acids in the human placenta. *Am J Clin Nutr* 2000;71:315S-322S
5. Desoye G, Shafrir E. Placental metabolism and its regulation in health and diabetes. *Mol Aspects Med* 1994;15:505-682
6. Plagemann A, Harder T, Kohlhoff R, Rohde W, Dorner G. Glucose tolerance and insulin secretion in children of mothers with pregestational IDDM or gestational diabetes. *Diabetologia* 1997;40:1094-100
7. Plagemann A, Harder T, Kohlhoff R, Rohde W, Dorner G. Overweight and obesity in infants of mothers with long-term insulin-dependent diabetes or gestational diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1997;21:451-6
8. Beaven SW, Tontonoz P. NUCLEAR RECEPTORS IN LIPID METABOLISM: Targeting the Heart of Dyslipidemia. *Annu Rev Med* 2006;57:313-29
9. Desvergne B, Michalik L, Wahli W. Be fit or be sick: peroxisome proliferator-activated receptors are down the road. *Mol Endocrinol* 2004;18:1321-32
10. Michalik L, Desvergne B, Dreyer C, Gavillet M, Laurini RN, Wahli W. PPAR expression and function during vertebrate development. *Int J Dev Biol* 2002;46:105-14
11. Kersten S, Wahli W. Peroxisome proliferator activated receptor agonists. *Exs* 2000;89:141-51
12. Barak Y, Nelson MC, Ong ES, Jones YZ, Ruiz-Lozano P, Chien KR, Koder A, Evans RM. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999;4:585-95
13. Barak Y, Liao D, He W, Ong ES, Nelson MC, Olefsky JM, Boland R, Evans RM. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:303-8
14. Portha B, Picon L, Rosselin G. Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia* 1979;17:371-7
15. Maloff BL, Boyd BK. Physiologic and cellular insulin action in a glucose-intolerant model of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes in rats. *Diabetologia* 1986;29:295-300
16. Spinella CJ, Mager M. Modified enzymatic procedure for the routine determination of glycerol and triglycerides in plasma. *J Lipid Res* 1966;7:167-9
17. Young DA, King DS, Chen M, Norris B, Nemeth PM. A novel method for measurement of triglyceride lipase activity: suitable for microgram and nanogram quantities of tissue. *J Lipid Res* 1988;29:527-32
18. Herrera E, Amusquivar E. Lipid metabolism in the fetus and the newborn. *Diabetes Metab Res Rev* 2000;16:202-10
19. Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P, Hauguel-de Mouzon S. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes* 2003;52:2951-8
20. Jawerbaum A, Gonzalez E. The role of alterations in arachidonic acid metabolism and nitric oxide homeostasis in rat models of diabetes during early pregnancy. *Curr Pharm Des* 2005;11:1327-42
21. Jawerbaum A, Sinner D, White V, Pustovrh C, Capobianco E, Gonzalez E. Modulation of nitric oxide concentration and lipid metabolism by 15-deoxy Delta12,14-prostaglandin J2 in embryos from control and diabetic rats during early organogenesis. *Reproduction* 2002;124:625-31
22. Capobianco E, Jawerbaum A, Romanini MC, White V, Pustovrh C, Higa R, Martinez N, Mugnaini MT, Sonez C, Gonzalez E. 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) levels in term placental tissues from control and diabetic rats: modulatory effects of a PPARgamma agonist on nitridergic and lipid placental metabolism. *Reprod Fertil Dev* 2005;17:423-33
23. Diamant YZ, Metzger BE, Freinkel N, Shafrir E. Placental lipid and glycogen content in human and experimental diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol* 1982;144:5-11

24. Asami-Miyagishi R, Iseki S, Usui M, Uchida K, Kubo H, Morita I. Expression and function of PPARgamma in rat placental development. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:497-501
25. Schaiff WT, Carlson MG, Smith SD, Levy R, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma modulates differentiation of human trophoblast in a ligand-specific manner. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3874-81
26. Jawerbaum A, Capobianco E, Pustovrh C, White V, Baier M, Salzberg S, Pesaresi M, Gonzalez E. Influence of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation by its endogenous ligand 15-deoxy Delta12,14 prostaglandin J2 on nitric oxide production in term placental tissues from diabetic women. *Mol Hum Reprod* 2004;10:671-6
27. Kim H, Haluzik M, Asghar Z, Yau D, Joseph JW, Fernandez AM, Reitman ML, Yakar S, Stannard B, Heron-Milhavet L, Wheeler MB, LeRoith D. Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist treatment in a transgenic model of type 2 diabetes reverses the lipotoxic state and improves glucose homeostasis. *Diabetes* 2003;52:1770-8
28. Robins SJ, Collins D, Wittes JT, Papademetriou V, Deedwania PC, Schaefer EJ, McNamara JR, Kashyap ML, Hershman JM, Wexler LF, Rubins HB. Relation of gemfibrozil treatment and lipid levels with major coronary events: VA-HIT: a randomized controlled trial. *Jama* 2001;285:1585-91
29. Whitelaw DC, Smith JM, Nattrass M. Effects of gemfibrozil on insulin resistance to fat metabolism in subjects with type 2 diabetes and hypertriglyceridaemia. *Diabetes Obes Metab* 2002;4:187-94
30. Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16:145-71
31. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998;93:241-52
32. Tarrade A, Schoonjans K, Pavan L, Auwerx J, Rochette-Egly C, Evain-Brion D, Fournier T. PPARgamma/RXRalpha heterodimers control human trophoblast invasion. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:5017-24
33. Schaiff WT, Bildirici I, Cheong M, Chern PL, Nelson DM, Sadovsky Y. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor signaling regulate fatty acid uptake by primary human placental trophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4267-75
34. Wang YX, Lee CH, Tiep S, Yu RT, Ham J, Kang H, Evans RM. Peroxisome-proliferator-activated receptor delta activates fat metabolism to prevent obesity. *Cell* 2003;113:159-70
35. Lee CH, Kang K, Mehl IR, Nofsinger R, Alaynick WA, Chong LW, Rosenfeld JM, Evans RM. Peroxisome proliferator-activated receptor {delta} promotes very low-density lipoprotein-derived fatty acid catabolism in the macrophage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:2434-9