



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

favet

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ANTIOXIDANTES EN LA EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA ENDOTELIAL
Y EL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO TIPO 2 EN OVARIOS, DURANTE
EL CICLO REPRODUCTIVO DE OVEJAS ADAPTADAS
Y NO ADAPTADAS A LA HIPOXIA HIPOBÁRICA**

CONSTANZA RAYEN PÉREZ SEPÚLVEDA

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ GAMBOA

Universidad de Chile

SANTIAGO – CHILE

2012

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1100189



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

favet

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ANTIOXIDANTES EN LA EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA ENDOTELIAL
Y EL FACTOR DE CRECIMIENTO FIBROBLÁSTICO TIPO 2 EN OVARIOS, DURANTE
EL CICLO REPRODUCTIVO DE OVEJAS ADAPTADAS
Y NO ADAPTADAS A LA HIPOXIA HIPOBÁRICA**

CONSTANZA RAYEN PÉREZ SEPÚLVEDA

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Biológicas Animales

NOTA FIRMA

PROFESOR GUÍA: VÍCTOR PARRAGUEZ G.

PROFESOR CORRECTOR: BESSIE URQUIETA M.

PROFESOR CORRECTOR: MÓNICA DE LOS REYES S,

SANTIAGO – CHILE

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1100189

2012

RESUMEN

La exposición de ovejas a la altura disminuye la fertilidad. Esto se asocia a la hipoxia hipobárica y al estrés oxidativo secundario a la hipoxia. Este fenómeno ha sido estudiado en ovejas gestantes situadas a 3.600 m.s.n.m, a las que se les ha suministrado antioxidantes, observándose un efecto beneficioso tanto en la madre como en las crías, cuyos resultados varían según el tiempo de residencia en altura. En este trabajo se evaluó la expresión inmunohistoquímica de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y el factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 (FGF-2) en folículos ováricos y cuerpos lúteos, en respuesta a la exposición por largo o corto tiempo a la altura, así como el efecto de la administración de vitaminas antioxidantes, en ciclos estrales sin concepción en ovejas. A nivel folicular la expresión de la eNOS fue mayor en los animales mantenidos a baja altura y solo se observó un efecto significativo de las vitaminas en este mismo grupo de animales, provocando una disminución de la expresión del péptido. El FGF-2 en folículos no varió significativamente. La expresión de eNOS en cuerpo lúteo, aumentó significativamente ($p < 0,05$) en ovejas expuestas recientemente a la altura, lo que no se observó en ovejas bajo estas mismas condiciones, con suministro de vitaminas. FGF-2 fue menor en ovejas recientemente expuestas a la hipoxia. La administración de vitaminas antioxidantes disminuyó su expresión en ovejas nativas de altura, pero lo incrementó en las recién expuestas. En conclusión, la expresión inmunohistoquímica de eNOS y FGF-2 en respuesta a la hipoxia/estrés oxidativo difiere entre las diferentes estructuras ováricas.

ABSTRACT

Sheep fertility is decreased by the exposure to high altitude, which is associated to hypobaric hypoxia and oxidative stress secondary to hypoxia. This phenomenon has been studied in pregnant sheep located at 3,600 meters above sea level, supplemented with antioxidants, showing a beneficial effect on both the mother and the offspring. The final effect of vitamins depends on high-altitude residence time length. This work assessed the immunohistochemical expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and fibroblast growth factor 2 (FGF-2) in sheep ovary follicles and corpus luteum as a response to short and long term high-altitude exposure and treatment with antioxidant vitamins in estrus non fertilizing cycles. Follicular eNOS was higher in animals kept at low altitude and a significant effect of vitamin treatment was observed only in this group of animals, leading to a decrease of the peptide expression. Follicular FGF-2 showed no significant change. Corpus luteum eNOS expression increased significantly ($p < 0,05$) in sheeps recently exposed to hypoxia, but not in those sheeps who received vitamins. FGF-2 was lower in sheeps recently exposed to hypoxia. Administration of antioxidant vitamins decreased FGF-2 expression in high-altitude native sheep, but increased it in sheep recently exposed to hypoxia. In conclusion, eNOS and FGF-2 immunohistochemical expression as a result of hypoxia/oxidative stress vary between different ovary structures.

INTRODUCCIÓN

La reproducción es un proceso biológico muy sensible a las condiciones ambientales (Hamel *et al.*, 2010). Entre las variables críticas para este proceso se encuentra la hipoxia hipobárica generada en ambientes de altura, la que produce, entre otros efectos, un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (*reactive oxygen and nitrogen species*; ROS y RNS, respectivamente) (RNS) (Agarwal *et al.*, 2005). Estas pueden llevar al organismo a un estado de estrés oxidativo, definido como un desbalance entre la generación celular de estos radicales libres y la capacidad antioxidante endógena, lo que puede conducir a daño en distintas biomoléculas como lípidos, proteínas, aminoácidos y DNA (Fattman *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2005; Zamudio *et al.*, 2007).

Las ROS son un subproducto de la respiración aeróbica y están involucradas en el proceso normal de “señalización” extra e intracelular (Zamudio *et al.*, 2007). A nivel ovárico, participan en la regulación de la maduración del ovocito, foliculogénesis, esteroidogénesis y en la función y lisis del cuerpo lúteo (Suzuki *et al.*, 1999; Jozwik *et al.*, 1999). Sin embargo, también se les asocia con procesos patológicos, algunos

relacionados con desórdenes en la fertilidad, que en este tejido se refleja en una regresión prematura del cuerpo lúteo, inhibición de la esteroidogénesis e, incluso, se puede comprometer el desarrollo folicular y de sus ovocitos, generando así una disminución en la fertilidad de la hembra (Behrman *et al.*, 2001; Agarwal *et al.*, 2005).

Los ovinos fueron introducidos a las alturas de los Andes desde hace aproximadamente 500 años, por lo que son una de las especies afectadas por la hipoxia hipobárica a causa de la altura. Bajo estas condiciones, presentan índices reproductivos y productivos inferiores comparados con los observados a nivel del mar (Fernandois, 2004; Parraguez *et al.*, 2005). Esto se ha descrito en ovejas nativas de la altura, como también en expuestas a la altura por períodos cortos (Parraguez *et al.*, 2011). Sin embargo, los efectos del ambiente de altura son de mayor magnitud en las ovejas recién expuestas que en las nativas de tierras altas, lo que indica un cierto grado de adaptación de estas últimas producto de la gran cantidad de generaciones viviendo en esta condición (Parraguez *et al.*, 2010).

En relación a la adaptación de las ovejas a la hipoxia hipobárica por altura, Parraguez *et al.*, (2006a), compararon

placentas de ovejas con distinta cantidad de tiempo viviendo en altura, concluyendo que la respuesta a la hipoxia cambia según el tiempo de exposición. En este caso, la morfología de la placenta de ovejas con larga residencia en la altura sugiere un mecanismo de adaptación eficiente. Por otro lado, en un estudio previo (Parraguez *et al.*, 2005) se describió que el crecimiento intrauterino del cordero también es afectado por la hipoxia y que su magnitud también dependerá del tiempo de exposición a ella. Además, se evaluó la fertilidad de ovejas en altura, por corto y largo período de residencia y el efecto de la terapia antioxidante. Aquellas hembras con larga residencia suplementadas con vitaminas fueron las que presentaron mayor proporción entre la cantidad de estros y preñeces. Por el contrario, aquellas ovejas de corta residencia en la altura y sin vitaminas no lograron preñez, confirmando así que la hipoxia por altura afecta negativamente la fertilidad de ovejas, pero en menor grado en aquellas con largo tiempo de exposición sugiriendo una adaptación a esta condición. Asimismo, la administración de antioxidantes evitó la disminución de la fertilidad, sugiriendo la participación del estrés oxidativo asociado a la hipoxia en el origen de los problemas de fertilidad en

ovinos que viven en altura (Parraguez *et al.* 2006b).

Por otro lado, es sabido que bajo condiciones normales, los antioxidantes endógenos convierten las ROS en agua, para prevenir el estrés oxidativo (Van Langendonck *et al.*, 2002). Asimismo se ha descrito en la mujer que el suministro de antioxidantes exógenos, como las vitaminas C y E, en condiciones de estrés oxidativo permite prevenir el daño que se genera en el proceso reproductivo (Agarwal *et al.*, 2005; Zamudio *et al.*, 2007).

La vitamina E es el antioxidante lipofílico más efectivo en la naturaleza, protegiendo los ácidos grasos insaturados en las membranas celulares del efecto dañino de radicales libres. En cambio, la vitamina C es un antioxidante hidrofílico, que a nivel intracelular previene el daño oxidativo de las proteínas (Carmona, 2011).

Parraguez *et al.* (2011) estudiaron el efecto de vitaminas antioxidantes (C y E) en las características placentarias y del recién nacido en ovejas sometidas y no sometidas al efecto de la hipoxia por altura. En dicho estudio se concluyó que la suplementación de estas vitaminas permite prevenir, durante la gestación ovina en altura, los efectos del estrés oxidativo sobre las características de la

placenta. Más aún, ovejas gestantes nativas o recién expuestas a la altura respondieron satisfactoriamente a este tratamiento, presentando corderos de mayor peso al nacimiento y placentas similares a las observadas en ovejas mantenidas a nivel del mar.

Si bien existe información del efecto de antioxidantes en ovejas preñadas bajo condiciones de hipoxia por altura, no hay estudios con respecto a este mismo efecto en hembras ciclantes.

Con respecto al tejido ovárico, se sabe que debido a la dinámica de crecimiento y regresión de folículos y cuerpos lúteos existe una marcada diferencia en la irrigación sanguínea del ovario en las diferentes fases del ciclo estral (Vila *et al.*, 2007). La angiogénesis es una respuesta al incremento de las demandas de oxígeno y otros nutrientes en el ovario durante el ciclo reproductivo (Tamanini y De Ambrogi, 2004; Grazul-Bilska *et al.*, 2006). Además, se asocia la calidad del ovocito y, en consecuencia, su destino (dominante o atrésico), a la calidad de su irrigación (Shimizu *et al.*, 2003; Grazul-Bilska *et al.*, 2006; Fraser, 2006; Robinson *et al.*, 2008). Asimismo, el desarrollo y funcionamiento del cuerpo lúteo son altamente dependientes del proceso angiogénico (Davis *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2008). Todo lo anterior

indica que bajo condiciones de hipoxia hipobárica este mecanismo será fundamental para suplir la carencia de oxígeno y evitar así fallas en el funcionamiento de este tejido.

Por otro lado, se ha descrito que la terapia antioxidante produce una disminución en los factores angiogénicos, mejorando también funciones de la placenta y el desarrollo del feto (Alegría, 2010). Esta aparente contradicción podría deberse a que la angiogénesis inducida por estrés oxidativo puede no ser eficiente para satisfacer las demandas incrementadas de oxígeno. Asimismo, la terapia antioxidante podría mejorar la capacidad de lecho vascular para recibir el flujo acorde a las necesidades dadas por la baja de oxígeno.

A nivel de folículos ováricos primordiales y primarios, si bien reciben suficientes nutrientes y oxígeno en forma pasiva desde vasos ubicados en el estroma, se requiere de la formación de una red de capilares alrededor de cada folículo, en su capa tecal interna, para su crecimiento (Fraser, 2006; Robinson *et al.*, 2009). La vascularización folicular determina entre otros, el contenido de oxígeno intrafolicular y el desarrollo potencial del ovocito. En condiciones de hipoxia intrafolicular, se puede incluso generar desórdenes de segregación cromosomal

(Agarwal *et al.*, 2005), por lo que esta estructura es altamente sensible y susceptible a la carencia de oxígeno.

Los factores angiogénicos, además, participan en la transición del folículo preovulatorio a cuerpo lúteo, por ejemplo, promoviendo la permeabilidad vascular, lo que permite el aumento de volumen del antro y la ruptura folicular (Tamanini y De Ambrogi, 2004). La formación del cuerpo lúteo es un fenómeno que implica una serie de cambios bioquímicos y morfológicos, incluyendo una intensa formación de vasos sanguíneos (Miyamoto *et al.*, 2010). Más aún, la mayoría de las células luteales tienen capilares adyacentes (al menos un 50% de las células que proliferan en el desarrollo del cuerpo lúteo son de origen vascular) (Davis *et al.*, 2003; Robinson *et al.*, 2009).

Uno de los principales factores involucrados en la angiogénesis es el óxido nítrico (NO), radical libre necesario en diversas funciones, como en la regulación del flujo sanguíneo, la angiogénesis en el ovario y, aparentemente, en la dinámica folicular (Agarwal *et al.*, 2005). La enzima óxido nítrico sintasa (NOS) es la encargada de mantener y regular las concentraciones de NO. Asimismo, su isoforma endotelial (eNOS) ha sido detectada en los folículos

tanto en las células de la teca como de la granulosa y en la superficie del ovocito durante el desarrollo folicular y del cuerpo lúteo de diferentes especies, incluso se ha caracterizado un cambio en su concentración tanto en el crecimiento como en la atresia folicular, así como durante el crecimiento, diferenciación y regresión del cuerpo lúteo (Grazul-Bilska *et al.*, 2006). Se ha descrito en folículos normales una mayor expresión de esta enzima en comparación con folículos atrésicos, lo que afirmaría el concepto de que el NO tiene un rol en la mantención y/o desarrollo de la vascularización durante la foliculogénesis, crecimiento folicular, y/o selección de los folículos para la ovulación. Asimismo, la concentración de esta enzima se asocia con el desarrollo y regresión luteal (Grazul-Bilska *et al.*, 2006). Además, la eNOS al igual que su producto, también son sensibles a periodos prolongados de hipoxia, incrementando su expresión a nivel de la arteria uterina (Grazul-Bilska *et al.*, 2006; Parraguez *et al.*, 2010). Xiao *et al.* (2001) han descrito este fenómeno en ovejas gestantes expuestas a hipoxia crónica de altura (expuestas durante 110 días a 3820 m.s.n.m.). Esta enzima presenta un significativo aumento en su cantidad en la placenta de ovejas en zonas de altura en los Andes (tanto nativas como recién expuestas), en

comparación a ovejas que se encontraban a nivel del mar. Esto demuestra que la hipoxia crónica regula la expresión de la eNOS en la placenta, sugiriendo una importante participación de esta molécula en la adaptación de la placenta a la hipoxia por altura (Parraguez *et al.*, 2010).

Otro compuesto involucrado en la angiogénesis es el factor de crecimiento fibroblástico tipo 2 o básico (FGF-2), cuya expresión es una respuesta tanto a los procesos isquémicos (*in vivo*) como a las condiciones de hipoxia (*in vitro*) (Conte *et al.*, 2008) y estrés hemodinámico (Boodhwani y Selke, 2009). Asimismo, se ha propuesto una importante participación de este factor en las funciones ováricas, como el desarrollo folicular y del cuerpo lúteo y la producción de progesterona, además de participar en el desarrollo embrionario temprano (Ergin *et al.*, 2008; Yamashita *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Este péptido se ha descrito como fundamental en la regulación de la formación y control del cuerpo lúteo en mujeres y vacas respectivamente, particularmente en el proceso de angiogénesis y síntesis de progesterona (Schams *et al.* 2004; Yamashita *et al.* 2008). En relación al comportamiento de este factor frente al estrés oxidativo, Black *et al.* (2008) destacan que en células de

la musculatura lisa de arterias pulmonares, la presencia de ROS puede aumentar la expresión de este factor, lo que a su vez genera un aumento de ROS en un ciclo autosostenido, sugiriendo una estrecha relación entre la generación de un estado de estrés oxidativo y la expresión del FGF-2.

La importancia de entender este fenómeno en la especie ovina en particular, radica en que estos animales fueron introducidos hace 500 años en la región altoandina del norte de Chile y hoy en día representan un factor importante en la sociedad y economía de las comunidades de la región (Parraguez *et al.*, 2005; Mocarquer, 2006). Por ejemplo, en la provincia de Parinacota, Chile, los ovinos representan el 70% de la población ganadera si no se considera a los camélidos sudamericanos (INE, 2007). Además, el ovino se ha usado como modelo de estudio para los problemas de fertilidad en la mujer que habita en tierras de altura, debido en parte a que la hembra ovina es un excelente modelo experimental para el estudio del reclutamiento, la selección y la dominancia folicular, las diferentes tasas de ovulación y los altos índices de prolificidad que presentan las distintas razas y variedades genéticas (Uribe *et al.*, 2010), por lo que investigar este fenómeno también genera un impacto en

la medicina reproductiva humana (Barry y Anthony, 2008).

En este trabajo se evalúa la expresión de la eNOS y el FGF-2 a través de inmunohistoquímica en el tejido ovárico, tanto en los folículos como en el cuerpo lúteo, durante un ciclo estral no concepcional, en ovejas nativas y recientemente expuestas a la altura (3600 m.s.n.m), con y sin administración de vitaminas antioxidantes. Esto permitirá obtener información que lleve a comprender mejor el rol del estrés oxidativo inducido por hipoxia y de los antioxidantes en la función reproductiva de la oveja.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar

Este estudio se realizó en dependencias del Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS) de la Universidad de Chile, ubicada a 3600 m.s.n.m en Putre, región Arica-Parinacota, Chile y en el laboratorio de fisiología y corrales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la misma universidad, ubicada a 540 m.s.n.m en Santiago de Chile.

Animales

Se utilizaron 12 ovejas criollas nacidas en alturas sobre 3500 m.s.n.m, descendientes de varias generaciones de rebaños nacidos en altura y 24 ovejas criollas nacidas bajo los 600 m.s.n.m cuyos progenitores y generaciones anteriores nacieron en esta condición. Estos animales fueron distribuidos en seis grupos de seis ovejas cada uno:

1. Ovejas nativas de altura mantenidas en altura (HH).
2. Ovejas nativas de altura mantenidas en altura con tratamiento antioxidante (HHV).
3. Ovejas nativas de baja altitud expuestas a la altura (LH).
4. Ovejas nativas de baja altitud expuestas a la altura con tratamiento antioxidante (LHV).
5. Ovejas nativas de baja altitud mantenidas a baja altura (LL).
6. Ovejas nativas de baja altitud mantenidas en baja altura con tratamiento antioxidante (LLV).

En los dos lugares de estudio los animales se mantuvieron separados en

dos corrales (con y sin suplemento de vitaminas antioxidantes). Su alimentación consistió en dos raciones diarias (de un kilo cada una) de heno de alfalfa, además de agua *ad libitum*. En los grupos suplementados, las vitaminas se administraron junto a una pequeña fracción de la ración de la mañana, de modo de asegurar el consumo. Asimismo, puesto que la presentación de la vitamina es en forma de polvo, la alfalfa se humedeció de modo que la vitamina se fijara a ella. La suplementación con vitaminas antioxidantes consistió en 500 mg de vitamina C y 350 UI de vitamina E (Quimagro S.A., Chile), a partir de una semana antes de la sincronización de celos hasta el final del experimento, el que fue realizado en época reproductiva de las ovejas (verano-otoño).

Preparación de los animales

Todos los animales fueron identificados con crotales plásticos y se desparasitaron antes de ser utilizados en este experimento.

Hembras: Se sincronizó la actividad reproductiva de las hembras de cada grupo. Para ello, cada oveja fue tratada con dos dosis del análogo sintético de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (125 μ g i.m. de cloprostenol), con un intervalo de siete días entre cada dosis.

Machos: Se utilizaron dos carneros criollos y nativos del lugar, los que fueron vasectomizados previo al inicio del experimento, en cada localidad. Estos se alternaron diariamente entre las ovejas con y sin tratamiento antioxidante.

Detección de celo

Inmediatamente después de la segunda administración de cloprostenol, a los carneros vasectomizados (retajos) se les pintó el pecho con una mezcla de tierra de color con aceite, para luego ser introducidos en los corrales de las ovejas. Esto con el objetivo de poder detectar las hembras en celo a través de la marca de pintura que dejarán los carneros en la grupa de aquéllas que monten.

Paralelamente, a partir del segundo celo, se hizo un seguimiento de la dinámica folicular y luteal de cada hembra mediante ecografías transrectales seriadas en cada oveja con un transductor de 7MHz.

Obtención, preparación y análisis de muestras

A partir del tercer celo luego de la sincronización, a través de laparoscopia y bajo anestesia con ketamina, se realizó una ovariectomía del ovario con el folículo dominante en la mitad de las ovejas de cada grupo. Asimismo, se realizó una ovariectomía del ovario con el cuerpo

lúteo a los cinco días después de la ovulación de este ciclo, en las ovejas restantes.

Estos ovarios fueron fijados en una solución de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato y luego incluidos en parafina para la obtención de cortes histológicos. Alternadamente, se utilizaron cortes (6 μ m) para tinción con hematoxilina-eosina (H-E) y para inmunohistoquímica para detección de eNOS usando el anticuerpo anti-eNOS (BD Transduction Laboratories, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), previamente probado en la especie (Parraguez *et al.*, 2010) y de FGF-2, usando el anticuerpo anti FGF-2 humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), el cual ha sido previamente utilizado en los tejidos reproductivos de la oveja (Zheng *et al.*, 1997).

Se observaron para cada una de las variables tres cortes por cada ovario, de los que se analizaron cinco campos ópticos por corte. La tinción para cada proteína fue evaluada mediante un microscopio de luz con magnificaciones de 100-400x. Las imágenes digitales fueron capturadas y almacenadas en un computador. A continuación se analizó la intensidad de la inmunoreacción a través del software ImageJ (NIH, USA, free

software), usando la metodología descrita por Girish y Vijayalakshmi (2004).

Análisis estadístico

Los valores de las densidades ópticas de eNOS y FGF-2 fueron analizados por medio de análisis de varianza (ANDEVA), siguiendo el modelo factorial incompleto, donde los factores de variación (independientes) fueron el origen de la oveja (altura o nivel del mar), lugar donde se desarrolla su actividad reproductiva (altura o nivel del mar) y suplementación con vitaminas (sin o con), y los factores dependientes fueron las densidades ópticas de eNOS y FGF-2 en cuerpo lúteo y folículo. Se realizó el test de Tukey cuando el ANDEVA indicó diferencias significativas. Los resultados se consideraron significativos cuando se observó $p \leq 0,05$. El análisis se realizó por medio del software SPSS15.0 (SPSS Inc., Delaware, Estados Unidos).

RESULTADOS

Inmunoexpresión de eNOS en folículo ovulatorio

La interacción entre el factor altura donde ciclan y el factor vitaminas generó variación en la inmunoexpresión de la

eNOS ($P < 0,05$). El grupo LL (ovejas nativas y mantenidas a baja altura, sin terapia antioxidante) presentó la mayor expresión de esta enzima y, por el contrario, las nativas de altura sin vitaminas (HH) y las nativas de baja altura con vitaminas (LLV) obtuvieron los valores más bajos (figura 1).

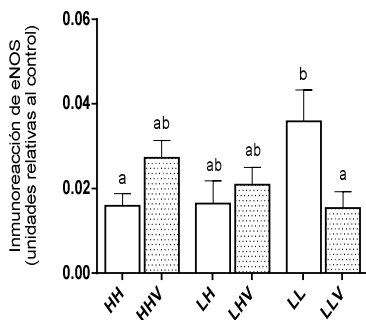


Fig.1 Expresión inmunohistoquímica de eNOS en Folículos de ovejas ciclando a 3.600 o a 600 m.s.n.m., respectivamente, tratadas y no tratadas con vitaminas C y E. Las letras sobre las barras indican la pertenencia a diferentes grupos por prueba de Tukey: a y b

Inmunoexpresión de eNOS en cuerpo lúteo

La cuantía de la inmunoreacción de la eNOS en cuerpo lúteo, varió según el origen de las ovejas ($P < 0,05$). Además, la interacción de este factor (origen) con las vitaminas y de éstas a su vez con el factor altura donde ciclan también generaron variación en la expresión de esta enzima en los diferentes grupos de ovejas ($P < 0,05$).

Aquellas ovejas subidas a la altura sin y con suplementación de vitaminas (LH y LHV respectivamente), mostraron una

notable diferencia de todas las demás, donde LH mostró la máxima expresión de eNOS y LHV la mínima. No se encontraron diferencias entre los grupos HH, HHV, LL y LLV (figura 2).

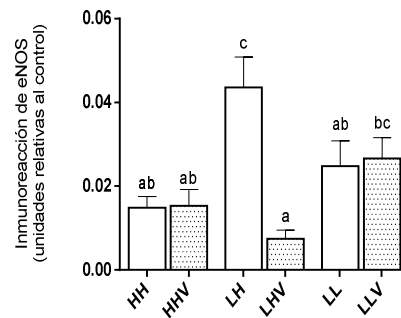


Fig.2 Expresión inmunohistoquímica de eNOS en Cuerpos Lúteos de ovejas ciclando a 3.600 o a 600 m.s.n.m., respectivamente, tratadas y no tratadas con vitaminas C y E. Las letras sobre las barras indican la pertenencia a diferentes grupos por prueba de Tukey: a, b y c

Inmunoexpresión de FGF-2 en folículo ovulatorio

En los folículos, los factores independientes (origen, altura donde ciclan y vitaminas) no mostraron un efecto significativo ($P = 0,584$) sobre la inmunoexpresión de FGF-2, por lo que no se realizó un análisis posterior (figura 3).

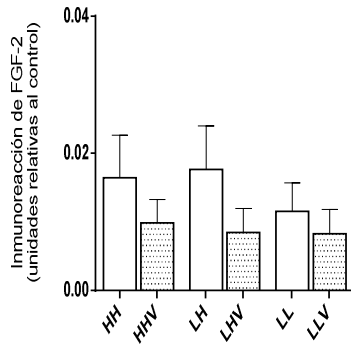


Fig. 3 Expresión inmunohistoquímica de FGF-2 en Foliculos de ovejas ciclando a 3.600 o a 600 m.s.n.m., respectivamente, tratadas y no tratadas con vitaminas C y E.

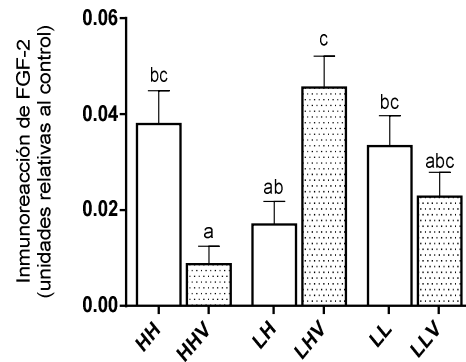


Fig. 4 Expresión inmunohistoquímica de FGF-2 en Cuerpos Lúteos de ovejas ciclando a 3.600 o a 600 m.s.n.m., respectivamente, tratadas y no tratadas con vitaminas C y E. Las letras sobre las barras indican la pertenencia a diferentes grupos por prueba de Tukey: a, b y c

Inmunoexpresión de FGF-2 en cuerpo lúteo

En cuerpo lúteo, en relación a esta proteína, se observó que el único factor que generó diferencias significativas en su inmunoexpresión, por sí sólo, fueron las vitaminas. Las interacciones del factor origen junto con vitaminas y el factor altura donde ciclan y vitaminas también generaron diferencias significativas. La menor expresión de FGF-2 lo presentó el grupo HHV, mientras que la mayor expresión el grupo LHV (figura 4).

DISCUSIÓN

Diversos estudios han evaluado la expresión de la eNOS y el FGF-2 en tejidos reproductivos. Sin embargo, en animales sometidos a un estado de estrés oxidativo a causa de hipoxia hipobárica por altura, la investigación se ha enfocado en hembras gestantes y tejidos como placenta o efectos sobre el feto y la terapia con antioxidantes. El presente estudio fue realizado en hembras no gestantes, enfocándose específicamente en el ovario y el comportamiento de estas proteínas frente al estrés oxidativo inducido por hipoxia y la administración de vitaminas antioxidantes.

La eNOS, a nivel folicular, varió su expresión entre los grupos de ovejas

según el factor altura donde ciclan en interacción con el factor vitaminas.

Ovejas sin exposición a la altura con vitaminas (LLV) y ovejas nativas de la altura sin vitaminas (HH) presentaron menor expresión de la eNOS. Esto sugiere que, por un lado, un grupo responde según la lógica de no aumentar esta enzima en un ambiente normóxico y, además, si hubiese aumento de las ROS por otra causa, estarían siendo neutralizadas con la terapia antioxidante.

Por otro lado, el grupo HH puede haber expresado valores bajos debido a la adaptación de estos animales a la hipoxia, al igual que estudios previos (Parraguez *et al.* 2006a), donde se comparó ovejas con distintos tiempos viviendo en altura, concluyéndose que ovejas con larga residencia modificaban la morfología de su placenta para compensar la carencia de oxígeno. Asimismo, otro estudio (Parraguez *et al.*, 2005) describieron que el crecimiento intrauterino del cordero también cambia según el tiempo de exposición a la hipoxia. Además, en Parraguez *et al.* (2006b) se comparó la fertilidad de las ovejas en altura con diferentes tiempos de residencia y con terapia antioxidante. Aquellas ovejas con larga residencia y terapia antioxidante presentaron la mayor proporción de estros y preñeces. Por el

contrario, no hubo preñez en el grupo sin vitaminas y con una corta residencia en altura. En consecuencia, este trabajo podría constituir un ejemplo más de que el grupo de ovejas con una larga residencia en altura presentan cierto grado de adaptación a la hipoxia hipobárica.

Por su parte, ovejas nativas y mantenidas a baja altura, sin vitaminas (LL) presentaron la mayor expresión de eNOS. Esto podría explicarse debido a que el ovario está sometido a constantes cambios, ya sea de remodelación, desarrollo y regresión de sus estructuras (Zackirsson, 1996; Reynolds y Redmer, 1998; Shimizu *et al.*, 2003). Esta condición hace que las moléculas que participan en su funcionamiento tengan concentraciones sumamente dinámicas y la eNOS no sería la excepción. Esta enzima es sensible a la hipoxia (Xiao *et al.*, 2001; Grazul-Bilska *et al.*, 2006; Parraguez *et al.*, 2010) y en el ovario pueden ocurrir estados transitorios de hipoxia intrafolicular, a medida que se va desarrollando el lecho vascular del folículo (Agarwal *et al.*, 2005), es decir, la expresión de esta enzima puede variar, en un ciclo normal, a causa de estos variables estados de hipoxia en los folículos ováricos. Por otra parte, justo antes de la ovulación esta enzima aumenta como parte de los mecanismos

vasculares que permiten este fenómeno (Zackirson, 1996).

La inmunexpresión de la eNOS en el cuerpo lúteo no varió frente al suministro de vitaminas en ovejas que se mantuvieron en su ambiente de origen (HH, HHV, LL y LLV). Por el contrario ovejas que fueron expuestas en forma aguda a hipoxia por altura (LH) mostraron un evidente aumento de esta enzima. Además, frente a la administración de vitaminas (LHV), estas ovejas mostraron una clara disminución de la eNOS. Esto coincide con los trabajos de Parraguez *et al.*, (2006b y 2010), en que las ovejas fueron más afectadas por la hipoxia hipobárica en cortos periodos de exposición a la altura. Asimismo, este resultado no sólo indica susceptibilidad de estos grupos, si no que efectividad de las vitaminas antioxidantes, como lo descrito por Parraguez *et al.*, (2011). Este último trabajo destaca que la suplementación con vitamina C y E en placenta de ovejas gestando en altura previnieron los efectos del estrés oxidativo inducido por hipoxia.

Por otro lado, se debe considerar que la variación de la expresión de la eNOS también depende de la vitalidad de los folículos. Grazul-Bilska *et al.* (2006) estudiaron la expresión de la eNOS a través del ciclo estral de ovarios en ovinos. Al respecto, la eNOS se

expresaba más en folículos sanos que atrésicos. Esto coincide con que la limitación del oxígeno estimula la angiogénesis folicular y la alteración de este mecanismo contribuye a la atresia folicular (Córdova *et al.*, 2010).

Asimismo, se ha visto que esta enzima se comporta diferente frente a la hipoxia por altura dependiendo del tejido. Xiao *et al.* (2001) evaluaron la expresión de la eNOS en ovejas sometidas a hipoxia crónica a nivel de arterias uterinas, renales y femorales, concluyendo que sólo aumentó a nivel de las arterias uterinas. Demostrando además, que ovejas gestantes presentan mayor expresión de esta proteína en hipoxia crónica. Por el contrario, ovejas no gestantes sólo aumentaron el ARNm de la eNOS (en arterias uterinas), no así la expresión de la proteína. Por lo tanto la preñez, por sí sola y en conjunto con la hipoxia crónica, aumentaría la expresión de la eNOS en arterias uterinas, pero no en arterias femorales y renales.

En consecuencia, se deben considerar muchos factores, como los recurrentes estados de hipoxia, la dinámica folicular en sí, el estado y tipo de tejidos y la participación, en este caso de la eNOS, en la fisiología del ovario, para entender el comportamiento de esta enzima frente

a un estado de estrés oxidativo generado por hipoxia.

En relación a la expresión de FGF-2 en el folículo, los resultados no mostraron diferencias entre los grupos de ovejas. Una posible explicación para este resultado es que la sensibilidad del mecanismo que regula la proteína frente a la hipoxia no sería suficiente para percibir los cambios en las concentraciones de oxígeno a nivel folicular.

En cuanto al cuerpo lúteo, la expresión del FGF-2 varió principalmente por el efecto que tuvo la terapia antioxidante sobre las ovejas. En los grupos nativos de la altura y el nivel del mar que se mantuvieron en su lugar de origen, se observó que frente a las vitaminas el FGF-2 disminuye (HH vs HHV y LL vs LLV). Esto concuerda con lo descrito por Black *et al.* (2008), donde señalan que este factor de crecimiento aumenta en presencia de las ROS y, por ende, debiese disminuir con las vitaminas C y E que neutralizan estos radicales libres. No obstante, en los grupos LH y LHV se observa la situación contraria, el FGF-2 es mayor en el grupo con vitaminas, lo que resulta contradictorio si se asume que estos animales serían los más susceptibles a la terapia antioxidante, por el cambio severo de ambiente. En consecuencia, se esperaría que el grupo

sin vitaminas (LH) bajo estas condiciones tuviese mayor expresión de esta proteína para tratar de compensar la carencia de oxígeno a través del proceso angiogénico. Asimismo, es sabido que el FGF-2 participa en la formación de la red vascular luteal, incluso Reynolds y Redmer (1998), definieron a este factor como el principal en el proceso de angiogénesis en esta estructura y en la proliferación y regresión luteal, por lo que este resultado contrario al esperado puede deberse a que existen otras moléculas o mecanismos que participan en la compensación del estado de estrés oxidativo a causa de hipoxia hipobárica (particularmente en el grupo LH), sugiriendo un esfuerzo del tejido ovárico por adaptarse a estas nuevas condiciones.

Finalmente, al igual que en la eNOS puede que el comportamiento de FGF-2 haya estado respondiendo a un fenómeno de hipoxia local transitoria, debido a la dinámica propia del ovario. Sin embargo, es necesario mayor investigación de este factor en el ovario, ya que si bien existe información de cómo participa en la fisiología ovárica y dinámica, no se ha descrito cómo se comporta frente al estrés oxidativo por hipoxia en este tejido, ya que los estudios que se han hecho han sido en tejidos no reproductivos.

CONCLUSIÓN

La expresión de la eNOS mostró variaciones tanto en folículo como en el cuerpo lúteo, frente a la hipoxia. Sin embargo, sólo los animales recién expuestos al ambiente hipóxico presentan una respuesta a la terapia antioxidante. Por su parte, la expresión del FGF-2 en los folículos no presentó diferencia. Sin embargo, en los cuerpos lúteos este péptido disminuyó como consecuencia de la hipoxia. Paradojalmente, la suplementación con vitaminas antioxidantes sólo aumentó la expresión del péptido en los animales recién expuestos a la hipoxia.

La participación de eNOS y FGF-2 en la respuesta ovárica a la hipoxia y estrés oxidativo, requiere mayor estudio.

REFERENCIAS

- Agarwal A, Gupta S, Sharma R.** Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3:28-49.
- Alegría, D.** Efectos de la terapia antioxidante sobre la expresión y localización placentaria de VEGF, NOS y leptina en ovejas que cursan su gestación en hipoxia hipobárica. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U.
- Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 2010; 20 p.
- Barry J, Anthony R.** The pregnant sheep as a model for human pregnancy. *Theriogenology.* 2008; 69: 55–67.
- Behrman H, Kodaman P, Preston S, Gao S.** Oxidative stress and the ovary. (abstract). *J Soc Gynecol Investig.* 2001; 8: 40 – 42.
- Black S, De Vol J, Wedgwood S.** Regulation of fibroblast growth factor-2 expression in pulmonary arterial smooth muscle cells involves increased reactive oxygen species generation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 294: 345–354.
- Boodhwani M, Selke F.** Therapeutic angiogenesis in diabetes and hypercholesterolemia: influence of oxidative stress **In:** Antioxidants and redox signaling. Mary Ant Liebert, Inc. 2009; 11: 1945-1959.
- Carmona, K.** Efectos del medioambiente normóxico y de las vitaminas C y E sobre características placentarias en ovejas preñadas originarias del altiplano chileno. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 2011; 19 p.
- Conte C, Riant E, Toutain C, Pujol F, Arnal J, Lenfant F, Prats A.** FGF-2 Translationally induced by hypoxia is

involved in negative and positive feedback loops with HIF-1 α . *Plos One*. 2008; 3: 1-9.

Córdova A, Saltijeral O, Ruiz G, Xolalpa V, Cortés S, Peña S, Córdova C, Córdova M, Méndez M, Huerta R, Juarez M, Guera J. Estrés oxidativo en gametos. *REDVET*. 2010; 11: 1 – 32.

Davis J, Rueda B, Spanel-Borowski K. Microvascular endotelial cells of the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003; 1: 1-15.

Ergin K, Gürsoy E, Başimoğlu Y, Başaloğlu H, Seyrek K. Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor-I, transforming growth factor-beta2, basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in developing rat ovary. (abstract). *Cytokine*. 2008; 43: 209-214.

Fattman C, Schaefer L, Oury T. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med*. 2003; 35: 236-256.

Fernandois, J. 2004. Efecto de la hipoxia hipobárica en variables sanguíneas durante la gestación en la hembra y feto ovino: comparación entre ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura. Memoria Título Médico Veterinario.

Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 2004; 54 p.

Fraser, H. Regulation of the ovarian follicular vasculature. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006; 4:1-9.

Girish, V.; Vijayalakshmi, A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J. Cancer*. 2004; 41: 47.

Grazul-Bilska A, Navanukraw C, Johnson M, Arnold D, Reynolds L, Redmer D. Expression of endothelial nitric oxide synthase in the ovine ovary throughout the estrous cycle. *Reproduction*. 2006; 132: 579–587.

Hamel S, Gaillard J, Yoccoz N, Loison A, Bonenfant C, Descamps S. Fitness costs of reproduction depend on life speed: empirical evidence from mammalian populations. *Ecology Letters*. 2010; 13: 915–935.

Instituto Nacional de Estadísticas. Censo agropecuario y forestal 2007. En: http://www.ine.cl/canales/chile_estadistico/censos_agropecuarios/censo_agropecuario_07_comunas.php Consultado el 12-01-2012.

Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M, Szamatowicz M. Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Mol Hum Reprod*. 1999; 5:409-413.

Miyamoto A, Shirasuna K, Shimizu T, Bollwein H, Schams D. Regulation of corpus luteum development and maintenance: specific roles of angiogenesis and action of prostaglandin F2 α . (abstract). Soc Reprod Fertil Suppl. 2010; 67:289-304.

Mocarquer, P. Concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona en ovejas gestantes adaptadas y no adaptadas a la altura, suplementadas con antioxidantes. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 2006; 39 p.

Parraguez V, Atlagich M, Díaz R, Bruzzone M, Behn C, Raggi L. Effect of hypobaric hypoxia on lamb intrauterine growth: Comparison between high and low altitude native ewes. Reprod Fertil Dev 2005; 17:497–505.

Parraguez V, Atlagich M, Díaz R, Cepeda R, González C, De los Reyes M, Bruzzone M, Behn C, Raggi L. Ovine placenta at high altitudes: Comparison of animals with different times of adaptation to hypoxic environment. Anim Reprod Sci 2006a; 95:151–157.

Parraguez V, Atlagich M, Behn C, Bruzzone M, Raggi L. Fertility in ewes at high altitude: comparison between animals with long- and short-time

residence at high altitude and the effect of antioxidant vitamins. (abstract). Reprod Domest Anim. 2006b. 41: 372.

Parraguez V, Atlagich M, Urquieta B, Galleguillos M, De Los Reyes M, Kooyman D, Araneda S, Raggi, L. Expression of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase is increased in the placenta of sheep at high altitude in the Andes. Can J Vet Res. 2010; 74: 193-199.

Parraguez V, Atlagich M, Araneda O, García C, Muñoz A, De Los Reyes M, Urquieta B. Effects of antioxidant vitamins on newborn and placental traits in gestations at high altitude: comparative study in high and low altitude native sheep. Reprod Fertil Dev. 2011; 23:285-296.

Reynolds L, Redmer D. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. J Anim Sci. 1998; 76:1671-1681.

Robinson R, Hammond A, Mann G, Hunter M. A novel physiological culture system that mimics luteal angiogenesis. Reproduction. 2008;135:405-413.

Robinson R, Woad K, Hammond A, Laird M, Hunter M, Mann G.

Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction*. 2009; 138:869-881.

Schams D, Berisha B. Regulation of corpus luteum function in cattle--an overview. *Reprod Domest Anim*. 2004; 39:241-251.

Shimizu T, Kawahara M, Abe Y, Yokoo M, Sasada H, Sato E. Follicular microvasculature and angiogenic factors in the ovaries of domestic animals. *J Reprod Dev*. 2003; 49:181 – 192.

Suzuki T, Sugino N, Fukaya T, Sugiyama S, Uda T, Takaya R, Yajima A, Sasano H. Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries: immunohistochemical localization and characterization. (abstract). *Fertil Steril*. 1999; 72:720.

Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. (abstract). *Reprod Dom Anim*. 2004; 39: 206.

Uribe-Velásquez L, Oba E, Lenz M, Vélez-Marín M, Correa-Orozco A. Desarrollo folicular en ovejas durante el ciclo estral natural e inducido con prostaglandinas. *FCV-LUZ*. 2010; 20: 417 –421.

Van Langendonck A, Casanas-Roux F, Donnez J. Oxidative stress and

peritoneal endometriosis. *Fertil Steril*. 2002; 77: 861-870.

Vila V, Pérez M, Perozo E. Vascularización arterial del ovario durante el ciclo estral en ovinos. *Rev. Cient. (Maracaibo)*. 2007; 17: 341-348.

Wang X, Schutzkus V, Huang W, Rosa G, Khatib H. Analysis of segregation distortion and association of the bovine FGF2 with fertilization rate and early embryonic survival. *Anim Genet*. 2009; 40:722-728.

Xiao D, Bird I, Magness R, Longo L, Zhang L. Upregulation of eNOS in pregnant ovine uterine arteries by chronic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001. 280: 812-820.

Yamashita H, Kamada D, Shirasuna K, Matsui M, Shimizu T, Kida K, Berisha B, Schams D, Miyamoto A. Effect of local neutralization of basic fibroblast growth factor or vascular endothelial growth factor by a specific antibody on the development of the corpus luteum in the cow. (abstract). *Mol Reprod Dev*. 2008; 75:1449-1456.

Zackirsson U, Mikuni M, Wallin A, Delbro D, Hedin L, Brännstrom M. Cell-specific localization of nitric oxide synthases (NOS) in the rat ovary during follicular development, ovulation and

luteal formation. Hum Reprod. 1996; 11:
2667-2673.

**Zamudio S, Kovalenko O, Vanderlelie J,
Illsley N, Heller D, Belliappa S, Perkins
A.** Chronic hipoxia in vivo reduces
placental oxidative stress. Placenta.2007;
28: 846–853.

Zheng J, Vagnoni E, Bird I, Magness R.
Expression of basic fibroblastic growth
factor, Angiotensin II Type-1 receptors in
the ovine placenta during the third
trimester of pregnancy. Biol Reprod.1997;
56: 1189-119.

