



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS ESCUELA



DE CIENCIAS VETERINARIAS

**“EFECTO DEL MEDIO AMBIENTE NORMÓXICO Y DE ANTIOXIDANTES SOBRE
LA PRESENCIA Y ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA ENDOTELIAL EN
PLACENTA DE OVEJAS PREÑADAS LUEGO DE SU TRASLADO DESDE EL
ALTIPLANO CHILENO”**

Paulina del Carmen Baeza González

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Cs. Biológicas
Animales

PROFESOR GUÍA: MARCO GALLEGUILLOS C.

SANTIAGO-CHILE

2012

Financiado por Proyecto FONDECYT 1070405



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y
PECUARIAS ESCUELA DE CIENCIAS
VETERINARIAS



“EFECTO DEL MEDIO AMBIENTE NORMÓXICO Y DE ANTIOXIDANTES SOBRE LA PRESENCIA Y ACTIVIDAD DE ÓXIDO NÍTRICO SINTASA ENDOTELIAL EN PLACENTA DE OVEJAS PREÑADAS LUEGO DE SU TRASLADO DESDE EL ALTIPLANO CHILENO”

Paulina del Carmen Baeza González

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Cs. Biológicas
Animales

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: MARCO GALLEGUILLOS C.
PROFESOR CONSEJERO: BESSIE URQUIETA M.
PROFESOR CONSEJERO: GUSTAVO FARÍAS R.

SANTIAGO, CHILE
2012

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a mis padres, que me enseñaron a ser perseverante y me guiaron en el camino para ser quien soy.

A mi familia que siempre me ha apoyado y ha estado ahí para mí, en los buenos y malos momentos y siempre se preocupan de mi bienestar y el de mi hijo.

A mis amigas y amigos, por las noches de estudio, tardes culturales y de entretenimiento, y por mostrarme el valor de esos pequeños y memorables momentos. A Mauricio por incentivar a culminar un ciclo y plantearme nuevos desafíos.

A mi profesor guía Sr. Marco Galleguillos, que me ha dado la confianza y conocimientos para crecer como profesional y como persona.

A mis compañeras de tesis por su paciencia, cooperación y por acompañarme en el proceso.

A la Dra. Bessie Urquieta por su corrección oportuna y sus palabras de aliento y al Dr. Víctor Hugo Parraguez por creer en mi capacidad de trabajo.

A los Dres. Héctor Adames, Rigoberto Solís y Eduardo Kessi por su compañía, consejos e inolvidables sobremesas.

Al Sr. Víctor Molina por su desinteresada y oportuna ayuda.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
RESUMEN.....	ii
SUMMARY.....	iii
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
OBJETIVO GENERAL.....	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
RESULTADOS.....	20
DISCUSIÓN.....	22
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA.....	29
ANEXO.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS).....	5
FIGURA 2. Expresión de eNOS en placenta fetal y materna	20
FIGURA 3. Actividad de NOS en placenta fetal y materna	21

RESUMEN

Preñeces ovinas en condiciones de hipoxia hipobárica resultan en fetos de menor tamaño, además de una serie de modificaciones placentarias, tales como en su vascularización, número y tamaño de los placentomas, entre otras. La hipoxia hipobárica se manifiesta como un estado de estrés oxidativo en estos animales, lo cual es factible de atenuar con un tratamiento antioxidante.

En este trabajo se determinó la expresión y actividad de la isoenzima endotelial de la óxido nítrico sintasa (eNOS), molécula involucrada en la angiogénesis y vasodilatación, eventos necesarios para que una gestación llegue a término. Se utilizaron ovejas criollas nativas de una condición de alta altitud, provenientes de Caquena, a 4.200 m.s.n.m. (HL) y ovejas criollas nativas de una condición cercana a nivel del mar (LL). Ambos grupos se mantienen en una condición de aproximadamente 500 m.s.n.m. donde cursan su gestación. La mitad de cada grupo fue suplementada, junto a la ración diaria de heno, con 500 mg de vitamina C y 350 UI de vitamina E por animal, hasta la recolección de muestras. Al término de los 100 días de gestación se determinó la expresión y actividad de eNOS en placentomas, separando la porción materna de la fetal, en todos los grupos. Se detectó la presencia de eNOS en todas las muestras analizadas mediante la técnica de *Dot blot*; esta característica no presentó cambios significativos ni por origen de las ovejas ni por compartimento analizado, materno o fetal. La actividad de eNOS tuvo un comportamiento similar, ya que no varió significativamente entre los grupos en estudio.

El tratamiento con vitaminas C+E, no generó un cambio considerable en la presencia y actividad de eNOS en ovejas que gestan a una altura cercana a nivel del mar, ya sean nativas de alta altitud o de una condición cercana a nivel del mar. Esto no excluye un efecto beneficioso de las vitaminas antioxidantes en ovejas que cursan su gestación en alta altitud.

Palabras claves: ovejas, placenta, eNOS, antioxidantes.

SUMMARY

Hypobaric hypoxia conditions in sheep pregnancies result in smaller fetuses, as well as a series of placental changes, such as vascularization, number and size of the placentomes, among others. Hypobaric hypoxia manifests itself as a state of oxidative stress in these animals, which is mitigated with an antioxidant treatment.

In this study we investigated the expression and activity of the endothelial isoform of nitric oxide synthase (eNOS), molecule involved in angiogenesis and vasodilation, events necessary for a pregnancy to term. Creole sheep native of high altitude, from Caquena, at 4,200 m (HL) and sheep native close to sea level (LL) were used.

Both groups were maintained at approximately 500 m altitude where they carried on their gestation. Half of each group was supplemented with 500 mg of vitamin C and 350 IU vitamin E per animal with the daily ration of hay. At day 100 of gestation it was determined eNOS expression and activity in the placenta of these groups. Measurement were made in four placentomes excised separating the maternal portion from the fetal one. It was detected eNOS in all samples analyzed by dot blot technique, a feature that did not present significant changes either by source of sheep or per compartment analyzed, maternal or fetal. The eNOS activity had similar behavior and did not vary significantly between the study groups.

Treatment with vitamins C + E did not generate a significant change in the presence and activity of eNOS in sheep that gestated at an altitude close to sea level. The latter does not exclude a beneficial effect of antioxidant vitamins on sheep gestation enrolled in high altitude.

Keywords: sheep placenta, eNOS, antioxidants.

INTRODUCCIÓN

La reproducción es una de las funciones más importantes de los seres vivos y por ello, el conocimiento de un órgano como la placenta, es fundamental para entender los procesos que conducirán a una gestación viable.

Durante la gestación, tanto ovinos como humanos, presentan un aumento de flujo sanguíneo uterino y gasto cardíaco (Joyce *et al.*, 2002). Si bien se requiere de la formación de nuevos lechos vasculares, el flujo sanguíneo uteroplacentario también aumenta durante la preñez para permitir el flujo requerido de oxígeno y nutrientes y así, lograr el óptimo crecimiento y desarrollo fetal. Uno de los mediadores implicados en este proceso es el óxido nítrico (NO), sintetizado en el endotelio vascular, que provoca localmente la relajación de la musculatura lisa subyacente, lo que reduce el tono vasomotor (Sheppard *et al.*, 2001).

La utilización de oxígeno en el metabolismo aeróbico, tiene como efecto indeseado la generación de una serie de sustancias nocivas conocidas como especies reactivas del oxígeno (ROS), que pueden interferir con procesos fisiológicos como la vasodilatación inactivando, en parte, el NO a nivel endotelial (Higdon y Frei, 2002). Se sabe que durante la gestación la extracción de oxígeno por parte del útero se incrementa notablemente, por lo tanto, es probable que el estrés oxidativo también aumente; estos cambios llevan a la madre a remodelar sus mecanismos de respuesta para lograr el éxito reproductivo.

Se ha descrito que en ovejas gestantes en condiciones de hipoxia hipobárica -cuando la presión parcial de oxígeno disminuye a medida que se incrementa la altitud- hay una ligera reducción en el número de placentomas, además de un incremento en el peso de la placenta y aumento en la vascularización placentaria (Parraguez *et al.*, 2006).

Cabe señalar, sin embargo, que no se ha estudiado la situación donde la gestación ocurra después de un cambio en las condiciones de altitud, desde un ambiente de baja presión de oxígeno hacia uno de normoxia.

En la presente memoria, se intentará conocer el efecto del tratamiento antioxidante (vitaminas C + E) sobre la expresión y actividad de NOS a nivel placentario, en ovejas gestantes en la condición anteriormente expuesta.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La placenta es el órgano a través del cual se produce el intercambio de gases respiratorios, nutrientes y desechos entre la madre y el feto. Debido a la importancia del conocimiento de este órgano, es que se busca un modelo de trabajo que sea análogo al desarrollo placentario en humanos, para ello muchos investigadores han trabajado con ganado ovino. Entre las ventajas de trabajar con la especie ovina se describe, por ejemplo, la capacidad de mantener especímenes experimentales en instalaciones en forma relativamente más fácil que el ganado bovino. Además, en los ovinos se pueden hacer mediciones de crecimiento y función de la placenta, lo cual se encuentra ampliamente documentado (Reynolds *et al.*, 2005).

La placenta ovina se denomina epiteliocorial, debido a que el corion fetal está en contacto directo con el epitelio uterino y, más específicamente, se le llama sindesmocorial, lo que implica que el epitelio uterino está fusionado con las células coriónicas binucleadas para formar el sincicio materno fetal. Macroscópicamente, la placenta ovina contiene entre 60 y 100 unidades estructurales conocidas como placentomas, los cuales constan de una porción caruncular materna y otra cotiledonaria o fetal, las cuales están interdigitadas (Kwon *et al.*, 2003; Reynolds *et al.*, 2005). Los placentomas se clasifican en cuatro tipos según diferencias morfológicas (A, B, C, D), en condiciones de normoxia predomina el tipo A;

mientras que en hipoxia hipobárica aumentan los demás tipos en desmedro del tipo A (Penninga y Longo, 1998; Alegría, 2009).

El corioalantoides es muy poco invasivo y permanece íntimamente asociado pero completamente intacto durante la gestación, lo cual permite evaluar carúncula y cotiledón de forma separada (Barry y Anthony, 2008). El placentoma permite la comparación de los patrones de crecimiento y desarrollo de la vasculatura materna con la fetal; esta estructura experimenta un importante crecimiento a lo largo de la gestación, por ejemplo el peso del tejido cotiledonario y del caruncular se incrementa cuatro veces desde el día 50 al 140 en oveja (Reynolds *et al.*, 2005).

Para que una gestación sea viable, es imprescindible la formación de nuevos lechos vasculares, lo cual es fundamental para el normal crecimiento y desarrollo de tejidos. Los mecanismos por los cuales se incrementa el flujo sanguíneo en la circulación fetoplacentaria, durante el periodo más importante de crecimiento fetal, implican vasodilatación y neovascularización en la placenta (Sheppard *et al.*, 2001).

La densidad de área capilar (área capilar como proporción del total de área de tejido), en la porción caruncular materna y cotiledonaria fetal, se incrementa exponencialmente desde el día 50 hasta el 140 *post* cruza (Reynolds *et al.*, 2005).

La angiogénesis durante las etapas primera y media de la gestación contribuye a aumentar el flujo sanguíneo. No obstante, dado que el último tercio de la gestación es el período de mayor aumento absoluto en la perfusión uterina (que ocurre tras el fin de un nuevo crecimiento de vasos), el mantenimiento de la vasodilatación en los vasos placentarios es crucial para el aumento de flujo sanguíneo uterino (Magness *et al.*, 2001).

El tono vascular del útero y la placenta, es controlado principalmente por la expresión de los mediadores vasculares a nivel local, cuya secreción es de naturaleza paracrina. En ausencia de inervación autonómica de los vasos sanguíneos fetoplacentarios, la

relajación vascular ocurre debido a la influencia de la circulación y producción local de vasodilatadores; el más conocido es el óxido nítrico (NO) que ayuda a regular la perfusión, al contrarrestar los efectos de mediadores vasoconstrictores (Zheng *et al.*, 2000; Sheppard *et al.*, 2001; Myatt, 2010; Sprague *et al.*, 2010).

El NO es una molécula sin carga y altamente soluble en ambientes hidrofóbicos. Esta propiedad permite su libre difusión a través de membranas biológicas y actuar a varias células de distancia del sitio de generación (Hill *et al.*, 2010). El NO se genera por la acción de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), que en presencia de oxígeno, cataliza la conversión de L-arginina a los productos finales, NO y citrulina (Figura 1) (Alderton *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2010; Sprague *et al.*, 2010). La NOS posee al menos tres isoenzimas codificadas por genes independientes, las cuales poseen distintas características y generan NO a distintas velocidades (Hill *et al.*, 2010).

La nNOS (tipo I o neuronal) está presente constitutivamente en neuronas, músculo esquelético y células epiteliales; en el cerebro, es activada fisiológicamente por agonistas del receptor N-metil-D-aspartato (Daff, 2010; Hill *et al.*, 2010).

La iNOS (tipo II o inducible) es la isoforma que tiene la mayor capacidad de generar NO, se expresa en múltiples tipos celulares en respuesta a estímulos inflamatorios como los inducidos por endotoxinas y citoquinas, por ejemplo, interleuquina-1. También se ha visto presente en forma constitutiva en algunos tejidos como epitelio pulmonar (Hill *et al.*, 2010). Se sabe que para lograr un efecto citotóxico en microorganismos, parásitos o células cancerígenas se necesitan niveles altos de NO para alterar, por ejemplo, los centros Fe-S del organismo en cuestión (Hill *et al.*, 2010).

La eNOS (tipo III o endotelial) genera los menores niveles de NO y fue descubierta originalmente en endotelio, pero también se encuentra en neuronas, células epiteliales y cardiomiocitos. La regulación de eNOS está íntimamente relacionada con eventos

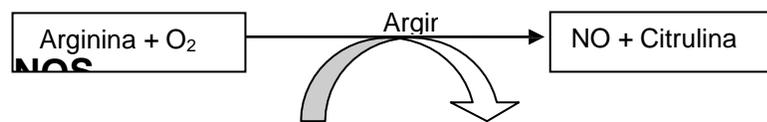
fisiológicos importantes en la función vascular como son el *shear stress* inducido por flujo sanguíneo (Hill *et al.*, 2010, Sprague *et al.*, 2010).

Esta enzima es un homodímero, que en su forma activa presenta las isoformas iNOS y eNOS con una masa molecular de 130 kDa, mientras la nNOS, 160 kDa. Para activar la enzima es necesaria la formación de un complejo calmodulina- Ca^{+2} , que promueva su dimerización (Alderton *et al.*, 2001; Li y Poulos, 2005). Estas isoformas también se diferencian en su dependencia de Ca^{+2} , siendo las formas nNOS y eNOS las que requieren Ca^{+2} para su actividad, y la forma inducible independiente de él. La

iNOS une calmodulina tan fuertemente que es básicamente Ca^{+2} independiente, y así se libera NO en mayor cantidad al no depender de aumentos de la concentración de Ca^{+2} intracelular para activarse, principalmente durante la inflamación o en reacciones de defensa inmunológica (Kwon *et al.*, 2004a; Li y Poulos, 2005; Fleming, 2010).

Las NOS son enzimas multi-dominio donde en el extremo N-terminal (dominio oxigenasa) se une el grupo prostético hemo, así como la tetrahidrobiopterina (BH_4). El extremo C-terminal (dominio reductasa) tiene sitios de unión para la FMN (Flavin mononucleótido), FAD (Flavin adenin dinucleótido) y NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato en su forma reducida). Además, el dominio de unión a calmodulina facilita el flujo de electrones desde el dominio reductasa al dominio oxigenasa (Daff, 2010; Kolluru *et al.*, 2010).

FMN BH_4 FAD



NADPH $\text{NADP}^+ + \text{H}^+$

Figura 1. Reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS).

La producción de NO por parte de la eNOS está regulada a distintos niveles, entre los cuales se puede nombrar, localización controlada en la célula, modificaciones postraduccionales, disponibilidad de sustratos y cofactores, unión a proteínas reguladoras e inhibidores celulares de la actividad de NOS (Hill *et al.*, 2010; Kolluru *et al.*, 2010). En la eNOS se ha descrito como mecanismo de activación a la fosforilación, la cual es regulada a su vez, por kinasas, fosfatasas e interacciones proteína-proteína; los principales sitios donde esta enzima puede ser fosforilada son residuos de serina (Ser) y, en menor medida, residuos de tirosina (Tyr) y treonina (Thr) (Kolluru *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2009). En bovinos se ha determinado que la fosforilación de Ser 617, 635 y 1179 resultan en la activación de eNOS, mientras que la fosforilación en Ser 116 y Thr 497 reducen la actividad de eNOS (Kolluru *et al.*, 2010).

Con respecto a la distribución subcelular, ésta cambia de acuerdo a las modificaciones que pueda experimentar la enzima, entre las cuales existe la miristoilación y palmitoilación. La miristoilación favorece la asociación a membranas en general, mientras la palmitoilación dirige las proteínas específicamente a la membrana plasmática; mientras la primera es necesaria para la actividad eNOS en la membrana, la segunda determina la localización subcelular de eNOS. El ciclo de despalmitoilación y repalmitoilación, resulta en un constante intercambio de la enzima entre el aparato de Golgi y la membrana plasmática (Kolluru *et al.*, 2010).

En cuanto a la interacción de eNOS con proteínas, se puede citar la unión a caveolina-1 y a proteínas de *shock* térmico 90 (Hsp90); la caveola se refiere a invaginaciones especializadas de la membrana plasmática compuestas de colesterol, glicoesfingolípidos y algunas proteínas estructurales, como la mencionada caveolina. La eNOS se une a caveolina-1 en la caveola para facilitar la miristoilación y palmitoilación, mediante lo cual la actividad de eNOS es reprimida (Kolluru *et al.*,

2010). Liu y colaboradores (2009), proponen que el mecanismo de inhibición de eNOS por parte de la caveolina-1 sería mediante la unión al dominio oxigenasa y reductasa de la enzima, lo cual compromete la unión a calmodulina. Como respuesta a estímulos externos, eNOS va y viene entre la caveola y compartimentos subcelulares como el citosol, aparato de Golgi y/o estructuras perinucleares; este intercambio permite la regulación de la actividad enzimática por localización (Kolluru *et al.*, 2010).

La Hsp90 por su parte, al unirse a eNOS en respuesta a histamina, VEGF o *shear stress* incrementa la actividad enzimática al permitir el desplazamiento de eNOS desde la caveola, para facilitar su unión a calmodulina (Liu *et al.*, 2009).

Las cantidades de NO producidos por la placenta ovina y el de eNOS de la arteria placentaria, se incrementan gradualmente desde el día 110 al 130 de preñez (Li *et al.*, 2004), momento en el cual se produce la mayor velocidad de crecimiento fetal en ovinos (Zheng *et al.*, 2000; Sheppard *et al.*, 2001).

Tanto la presión arterial media y en mayor medida, la resistencia vascular sistémica se reducen durante la gestación. En el endotelio vascular uterino se ha observado un aumento en la actividad, RNAm y la expresión de la eNOS durante la preñez, lo que no ocurre en otro tipo de endotelios. Además, el NO y su mediador cGMP (Guanosina monofosfato cíclica), aumentan durante la preñez (Magness *et al.*, 2001; Joyce *et al.*, 2002). El NO derivado de endotelio, relaja localmente la musculatura lisa subyacente al vaso sanguíneo mediante la activación de la guanilato ciclasa soluble, que cataliza la síntesis de cGMP, lo que reduce el tono vasomotor (Sheppard *et al.*, 2001).

Un potente estímulo para la producción de NO en el endotelio y la posterior vasodilatación, es el llamado *shear stress*, es decir, fuerzas de fricción provocadas por la circulación de la sangre sobre la pared del vaso. El NO modula variados procesos fisiológicos y patológicos relacionados con el endotelio, como la

proliferación de células endoteliales, el tono vascular y la respuesta inflamatoria (Li *et al.*, 2004). El incremento sustancial de liberación de NO inducido por *shear stress* parece ser en gran medida, independiente de Ca^{+2} intracelular (Kolluru *et al.*, 2010).

Otro antecedente que avala la importancia de las NOS en el territorio vascular es su inhibición local en arteria uterina, usando un inhibidor competitivo de las isoformas llamado L-NAME (N-nitro-L-arginina metil ester) al final de la gestación, cuyo efecto se refleja en una disminución de las concentraciones venosas uterinas de NO, de GMPc y también del flujo sanguíneo uterino en ovejas preñadas (Vagnoni *et al.*, 1998; Magness *et al.*, 2001).

La gestación en humanos en condiciones de alta altitud, ha sido relacionada en diversos estudios con una disminución importante en el peso de los recién nacidos, en comparación a personas que viven a nivel del mar. Al respecto, Jensen y Moore (1997), encontraron una disminución promedio de 100 g en el peso fetal por cada 1000 m de altitud que se incrementaba la residencia de la madre, durante su gestación. La alta altitud se relaciona además, con la presentación de crecimiento fetal asimétrico, sufrimiento fetal, partos prematuros, hipertensión, pre-eclampsia y problemas respiratorios del neonato (Parraguez *et al.*, 2011).

Estudios comunicados por Moore y colaboradores (2004) con poblaciones originarias de altitud del Tíbet (desde hace 20.000 años) y de los Andes (10.000 años), demuestran un tercio de la reducción de peso al nacimiento que aquellas poblaciones que viven en altura en Europa, China o Norteamérica desde hace menos de 500 años. Lo anterior representaría adaptaciones funcionales, lo cual da cabida a una teoría evolutiva expresada en características del metabolismo y fisiológicas que harían a estas poblaciones distintas de otras que viven a menor altitud (Beall, 2007).

Las tibetanas en gestación incrementan el flujo sanguíneo a las arterias uterinas, incrementando la entrega de oxígeno al útero y a la placenta, en mayor medida, que aquellas mujeres expuestas en forma aguda a la hipoxia y que provienen de tierras

bajas, lo que les permite a las primeras tener, en comparación, bebés más pesados. Este mecanismo se explicaría debido a los tibetanos generan mayor cantidad de NO a nivel vascular (Beall, 2007).

El mismo efecto (tener bebés más pesados en comparación a otras poblaciones sometidas a altura) se observa en poblaciones Andinas, pero esta vez la mayor entrega de oxígeno a la placenta es por aumento de la ventilación y saturación de hemoglobina con oxígeno; ambas estrategias aparecerían en un punto de la vida cuando la selección natural se hace casi imprescindible para el éxito del proceso reproductivo y el desarrollo de la población (Beall, 2007)

Algo similar se observó en estudios realizados en ovejas preñadas, en donde se estudiaron 3 grupos de hembras, uno originario de baja altitud gestando en esa condición, otro originario de baja altitud gestando en altura y el tercero de altura manteniendo su preñez en hipoxia hipobárica, encontraron que el primer grupo presentó los mayores pesos de las crías al nacimiento y esta diferencia era significativa en comparación a los otros dos, sin embargo, entre ambos grupos gestando en altura no observaron diferencias significativas, es más, se observó una tendencia a mayor peso de los neonatos del grupo originario de altura, lo cual podría corresponder a una incipiente respuesta adaptativa a una residencia por largo tiempo a la altura (Parraguez *et al.*, 2005; Parraguez *et al.*, 2006).

La especie ovina fue introducida en las montañas de Los Andes por los colonos europeos durante la colonia, lo que implica que han vivido expuestos a la alta altitud por aproximadamente 500 años (Parraguez *et al.*, 2005) y, junto a los camélidos propios de la región, constituyen una importante fuente de ingresos para los habitantes altiplánicos (Pérez, 2011).

Estudios realizados en condiciones de hipoxia hipobárica en ovejas gestantes han demostrado adaptaciones placentarias macroscópicas. Estas respuestas incluyen una ligera reducción en el número de placentomas, un incremento en el peso de la

placenta y un aumento en la vascularización placentaria. Se ha determinado que en las gestaciones de ovejas con larga residencia en altura, se incrementa el diámetro del placentoma, la superficie de contacto cotiledón-carúncula y el área ocupada por la vasculatura del placentoma, pero disminuye el número total de placentomas (Parraguez *et al.*, 2006).

Adicionalmente se ha observado el aumento de biomarcadores de estrés oxidativo en ovinos que cursan su gestación en altura y el efecto beneficioso de la suplementación de vitaminas C y E sobre el peso de los recién nacidos (Parraguez *et al.*, 2011)

En ovejas, la extracción de oxígeno por parte del útero grávido se incrementa levemente a partir de la mitad y a lo largo de la gestación, mientras que el flujo sanguíneo uterino se incrementa en aproximadamente tres veces (Reynolds *et al.*, 2010).

El desarrollo de procesos metabólicos que consumen oxígeno genera variados subproductos en el organismo, entre los cuales se consideran las especies reactivas del oxígeno (ROS, “reactive oxygen species”). Las ROS, así como el NO, son producidos en cantidades limitadas en respuesta a un estímulo fisiológico y son considerados mediadores de señales intra e intercelulares. Se asume en general que, un aumento en el metabolismo aeróbico, genera aumento en los niveles de ROS, lo que puede llevar a un estado de estrés oxidativo, causando daño a lípidos, proteínas y DNA, si es que se llega a sobrepasar los mecanismos antioxidantes propios del organismo (Dosek *et al.*, 2007).

Las membranas biológicas suelen ser atacadas por las ROS, debido en parte a su contenido de ácidos grasos insaturados. Se ha demostrado que un aumento en el suministro de oxígeno resulta en un incremento en la producción mitocondrial de ROS. Además, se ha sugerido que el 1-2 % del oxígeno que entra a la mitocondria se transforma a anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual es altamente reactivo (Dosek *et al.*, 2007). Sin embargo, el radio de acción del $O_2^{\cdot-}$ se ve limitado por su baja solubilidad

en lípidos, transporte limitado de membrana y por ser removido debido a la acción de la enzima superóxido dismutasa (Myatt y Cui, 2004).

La interacción entre NO y el $O_2^{\cdot-}$ genera anión peroxinitrito ($ONOO^-$), el cual es un potente prooxidante, altamente tóxico y de mayor vida media que el NO, iniciando peroxidación de lípidos y nitración de residuos de tirosina en proteínas, pudiendo también oxidar al DNA; incluso puede impedir la respiración celular por cuanto inhibe el transporte de electrones mitocondrial. Además, ya que el NO difunde libremente, a diferencia del anión superóxido, se plantea que la reactividad del peroxinitrito podría controlarse por la localización de la producción de $O_2^{\cdot-}$ (Hill *et al.*, 2010; Myatt, 2010). El NO también modula la respiración mitocondrial y el estatus redox de las células en mamíferos y, podría reaccionar con moléculas que contienen el grupo tiol para formar el derivado nitrosotiol (Escudero y Sobrevia, 2008).

La formación óptima de NO depende de la disponibilidad de cofactores intracelulares, en particular tetrahidrobiopterina, la cual entre otras funciones parece estabilizar la formación del dímero para hacer funcional a la NOS (Heller *et al.*, 2006; Montezano y Touyz, 2011). Cuando los niveles de BH_4 son muy reducidos, la enzima ve alterada su estructura y la reducción del oxígeno molecular no logra acoplarse a L-arginina, lo que lleva a desacoplar (*uncoupling*) la actividad catalítica de eNOS; en este escenario la enzima comienza a producir anión superóxido en vez de NO, lo cual contribuye a incrementar las ROS, a la vez que provoca disfunción endotelial (Heller *et al.*, 2006; Myatt, 2010; Montezano y Touyz, 2011). El $O_2^{\cdot-}$ se genera por acción de diversas enzimas en células vivas, como NADPH oxidasa, xantina oxidasa, enzimas flavinas y las de la cadena transportadora de electrones mitocondrial (Myatt y Cui, 2004), el *uncoupling* por su parte, está basado en experiencias *in vitro*, pero no se sabe con certeza cómo operaría este fenómeno *in vivo* (Montezano y Touyz, 2011).

Un antioxidante se define como "una sustancia que cuando se presenta en baja concentración en comparación con un sustrato oxidable, elimina significativamente o previene la oxidación de ese sustrato" (Packer y Obermüller-Jevic, 2002).

La mayoría de los sistemas antioxidantes están presentes en la placenta, tanto enzimáticos, incluyendo Mn y Cu/Zn superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasa, tiol/disulfido oxidoreductasa, como no enzimáticos, por ejemplo, glutatión, vitaminas C y E (Myatt y Cui, 2004).

La vitamina E o Tocoferol exhibe variados y complejos efectos biológicos, además de propiedades antioxidantes, de proliferación celular y modulación de señalización celular, por ejemplo, inhibiendo la proteína quinasa C. Los tocoferoles encontrados en mayor medida en los tejidos de mamíferos son el alfa-tocoferol y el gama-tocoferol; estudios en humanos han mostrado que el -tocoferol constituye el 80 a 90% de la vitamina E en el plasma, lo cual se debería a la incorporación preferencial que tiene el -tocoferol en lipoproteínas VLDL y un rápido catabolismo de gamma-tocoferol dentro del hígado (Kasimanickam *et al.*, 2010).

Todas las isoformas naturales y sintéticas de la vitamina E tienen la capacidad de inhibir la peroxidación de lípidos, destruyendo principalmente cadenas de radicales peróxidos, por lo que protege a los ácidos grasos de la oxidación. Además, reacciona con distintos radicales y ROS, por lo que provee diferentes grados de defensa al organismo (Packer y Obermüller-Jevic, 2002). Dado su rango de actividad biológica, el tocoferol podría requerir de su consumo continuo para ser beneficioso; una vez ingerida, la vitamina E administrada oralmente tiene un *plateau* en el plasma de 24 horas, pero no es completamente distribuida a todos los compartimentos biológicos hasta después de una semana de su consumo (Kasimanickam *et al.*, 2010).

El -tocoferol es capaz de potenciar la actividad de eNOS al mantener la fosforilación del residuo de aminoácido serina 1177. El efecto de el -tocoferol es α

potenciado por ácido ascórbico, el cual por sí sólo no influencia la fosforilación de eNOS (Heller *et al.*, 2006).

La vitamina C o ácido ascórbico, por su parte, presenta variadas propiedades que la hacen un antioxidante importante dentro de los sistemas biológicos. El ascorbato, puede reaccionar y reducir prácticamente todas las ROS y especies reactivas del nitrógeno (RNS) fisiológicamente relevantes, entre ellos anión superóxido, radicales hidroxiperoxilos, radicales peroxilos acuosos, oxígeno singlete, ozono, dióxido de nitrógeno, radicales nitróxidos y ácido hipocloroso. La vitamina C también actúa como co-oxidante, es decir, permite reciclar la vitamina E por regeneración de tocoferol a partir de un radical tocoferilo. Este hallazgo puede ser muy importante pues experimentos *in vitro*, han determinado que un tocoferilo puede actuar como pro-oxidante en ausencia de co-oxidantes como la vitamina C (Higdon y Frei, 2002; Heller *et al.*, 2006). Además, se ha observado, que el ascorbato es el antioxidante endógeno de la fase acuosa más eficaz en el plasma humano bajo distintas condiciones de oxidación. Según Higdon y Frei (2002), aunque otros antioxidantes endógenos son capaces de disminuir la tasa de peroxidación lipídica, sólo el ascorbato tiene la reactividad suficiente para interceptar oxidantes antes de que sean detectables, los cuales podrían causar daño a las membranas.

Se ha comprobado que la vitamina C aumenta la actividad de la eNOS al recuperar su cofactor, BH₄, al reciclar sus derivados oxidados y por lo tanto, mantiene la forma activa de la enzima previniendo el *uncoupling* (Higdon y Frei, 2002; Heller *et al.*, 2006).

Además, la importancia del anión superóxido como mecanismo de disfunción endotelial, lleva a pensar que el ácido ascórbico ejerce su efecto beneficioso al ligar el anión superóxido y así proteger de la inactivación al NO (Higdon y Frei, 2002; Heller *et al.*, 2006).

La suplementación con vitaminas C y E durante la gestación en ovejas que viven en altura, en condiciones de hipoxia hipobárica, previene el estrés oxidativo materno y sus efectos, tanto en las características placentarias como en su función, ya que permite incrementar el peso del feto al nacimiento, aboliendo las diferencias observadas entre ovejas nativas y recién expuestas a la altura, en ausencia de una administración diaria de antioxidantes (Parraguez *et al.*, 2011).

Un estudio reciente en placenta de ovejas criollas con 100 días de preñez en condiciones de hipoxia hipobárica, reporta la presencia sólo de la isoforma endotelial de NOS, no encontrándose iNOS ni nNOS mediante técnicas de inmunohistoquímica (Alegría, 2010) y *western blot* (Pérez, 2011).

En la literatura no existe información sobre el efecto del cambio de un ambiente hipóxico a uno normóxico, sobre variables reproductivas en animales o humanos adaptados al ambiente hipóxico.

Es por ello que se busca conocer el efecto del tratamiento antioxidante (vitaminas C + E) sobre la expresión y actividad de NOS a nivel placentario, en ovejas aclimatadas a la hipoxia hipobárica que se trasladan a nivel del mar donde se preñan y cursan su gestación.

OBJETIVO GENERAL

Establecer el efecto de la administración de antioxidantes (vitaminas C y E), sobre la expresión y actividad de NOS en placenta de ovejas originarias de altura que cursan su gestación a nivel del mar (en la Región Metropolitana).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En placenta de ovejas originarias de altura que cursan su gestación a nivel del mar:

1. Determinar la presencia de la isoforma endotelial de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS) en ovejas con 100 días de gestación en normoxia, con y sin tratamiento antioxidante.
2. Evaluar la actividad de NOS en la placenta de ovejas originarias de altura del grupo que recibe el tratamiento antioxidante y del grupo control sin tratamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar: El estudio tuvo lugar en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ubicada en Santiago, a una altitud aproximada de 500 m.s.n.m. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones de la granja educativa “Mundo Granja” y los procedimientos de laboratorio se realizaron en las dependencias del Departamento de Ciencias Biológicas Animales.

Animales: Los individuos en este estudio corresponden a ovejas criollas nativas del nivel del mar y ovejas criollas nativas de altura, estas últimas provenientes de la localidad de Caquena, ubicada a 4.200 m.s.n.m. Los animales fueron llevados hasta la Facultad donde se encastaron con machos de fertilidad comprobada, para desarrollar su gestación en este lugar. Desde su traslado, los animales recibieron una alimentación de 2 Kg de heno de alfalfa por día por animal, suministrado en dos raciones y agua a libre disposición; esta cantidad satisface los requerimientos de una oveja en gestación según el “National Research Council” (NRC, 1985). La mitad de los animales recibieron, junto a la primera ración diaria de heno, 500 mg de vitamina C y 350 UI de vitamina E, todos los días hasta el procedimiento de obtención de muestras. Para el estudio se consideraron ovejas con una sola cría en el vientre. El grupo de animales provenientes de la altura se subdividió en aquellos con suplemento antioxidante (grupo **HLV**, n=5) y su control sin tratamiento (grupo **HL**, n=5). A su vez, los diez animales provenientes de baja altitud se subdividieron en un grupo con suplemento vitamínico (grupo **LLV**, n=5) y su control sin tratamiento (grupo **LL**, n=5).

Protocolo de obtención de muestras: Entre los 96 y 100 días de gestación (término 148 días), las ovejas fueron anestesiadas con Ketamina (20 mg/Kg i.m.) y se les realizó una laparotomía media infraumbilical, donde se escindió útero y se extrajo el feto y se procedió inmediatamente a la toma de muestras de sangre de arteria y vena umbilical. Luego el feto fue sacrificado por sobredosis de tiopental sódico y se

procedió a colocar catéteres en la arteria umbilical y uterina, seguido de una histerectomía, para continuar con la perfusión placentaria con 4 L de solución amortiguadora de fosfato 0,2 M, pH 7,4; terminado aquello, se escindieron cuatro placentomas, en los cuales se hizo una separación de los componentes materno (carúnculas) y fetal (cotiledones), luego fueron disecados y rotulados. Estas muestras se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento. Las ovejas se sometieron a eutanasia con el mismo método que los fetos.

Los métodos usados fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (anexo 1) y por la Comisión Asesora de Bioética del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT).

Detección de eNOS mediante *dot blot*:

Se detectó la expresión placentaria de la isoenzima eNOS mediante *dot blot*, para ello se procedió a la homogeneización de aproximadamente 1 g de tejido con 2 mL de solución tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,4, en presencia de inhibidores de proteasas (β -Mercaptoetanol 12 mM, Leupeptín 2 μ M, Pepstatin 1 μ M, Fenilmetilsulfonil fluoruro 1 μ M, EGTA 0,1 mM y EDTA 0,1 mM, SIGMA, St. Louis, EEUU), en un sistema tipo ultraturrax a 13.000 r.p.m (3 veces por 15 segundos, en un baño de hielo). A continuación, cada homogeneizado se centrifugó a 1.000 x g por 20 min a 4

°C y se recuperó el sobrenadante, obteniendo diferentes alícuotas que fueron almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento.

Una alícuota de cada muestra se utilizó para determinar la concentración de proteínas de acuerdo al método de Lowry *et al.* (1951), posteriormente, se traspasó cada muestra a una membrana de PVDF (Polivinildenedifloride, Inmun-Blot, BioRad) mediante un sistema *dot blot*, calculando el volumen de muestra para mantener igual cantidad de proteína para cada una (75 μ g); la membrana fue lavada previamente con metanol por 30 seg y posteriormente con una solución TBS-Tween (Tris-HCl 20

mM, NaCl 137 mM y Tween-20 a pH 7,6). Luego la membrana PVDF se mantuvo en una solución de bloqueo durante 1 h (leche descremada al 6 % en TBS-Tween), a continuación se realizaron 3 lavados de 10 min en agitación con solución TBS- Tween y se incubó con el anticuerpo primario monoclonal anti-eNOS preparado en ratón (Transduction Laboratories, Kentucky, USA) con una dilución de 1:250 durante toda la noche a 4° C.

Al día siguiente se lavó la membrana de la misma forma con la solución TBS-Tween (3 veces) y se incubó con el anticuerpo secundario anti-Ig G1 de ratón conjugado con peroxidasa de rabanita (ImmunoPure®, Pierce, IL, EEUU) con una dilución de 1:4000 durante 1 h, en agitación. Luego del lavado, el revelado de la misma se realizó con el sistema de quimioluminiscencia (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), cuya reacción positiva a la eNOS se tradujo en la fluorescencia del punto correspondiente. Estos puntos fueron expuestos a una película fotosensible (CL-X Posture ®, Pierce ®), la cual fue escaneada para someterse a un programa computacional (Un- Scan-It Gel versión 4.1 para Windows), que mide los pixeles correspondientes a cada punto positivo. El número de pixeles es proporcional a la cantidad de moléculas de eNOS detectadas.

Determinación de la actividad de óxido nítrico sintasa (NOS):

La actividad de NOS se determinó mediante el método de conversión de ³H-arginina a ³H-citrulina descrito en Bredt y Snyder (1990), con algunas modificaciones detalladas en (Galleguillos *et al.*, 2001). Brevemente, para determinar la actividad de NOS se usó como sustrato [³H]-arginina (NEN, Boston, EEUU), en un medio que contenía NADPH 1 mM, CaCl₂ 1,25 mM, FMN 20 μM, FAD 20 μM y BH₄ 10 μM. La reacción se realizó a 30° C por 45 min y fue detenida con 1,8 mL de HEPES 30 mM (pH 5,5) con EDTA 3 mM en hielo. La separación de arginina de la citrulina se realizó a través de cromatografía de intercambio iónico en columnas con 1 mL de resina Dowex (50x8-400, SIGMA, St. Louis, EEUU). La ³H-citrulina eluída de la

columna se recibió en un vial con 9 mL de líquido de centelleo (Bioscint, Atlanta, EEUU) y posteriormente fue leído en un contador de centelleo líquido.

La actividad enzimática se expresó en pmoles de citrulina/min x mg de proteína total. Con la finalidad de descartar actividad o degradación del sustrato por otras enzimas, se utilizaron varios controles paralelamente: medio de reacción sin Ca^{2+} , sin cofactores, sin calmodulina en presencia de trifluoperazina (la cual inactiva a la calmodulina). Cada muestra se analizó al menos en duplicado.

Análisis de los datos

Los resultados obtenidos para las características de eNOS fueron analizados mediante ANDEVA, considerando el origen y el tratamiento con vitaminas como fuentes de variación; las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$. Los análisis se hicieron utilizando el programa Statistica, versión 7. Los resultados de la expresión placentaria de eNOS fueron citados como promedio de pixeles desviación estándar.

±

RESULTADOS

Con respecto a la expresión placentaria de eNOS, los resultados analizados mediante *dot blot*, muestran que la enzima se expresa en todos los grupos en estudio y el análisis estadístico no evidenció diferencias significativas entre los grupos, tanto para la porción fetal como para la porción materna de la placenta (figura 2).

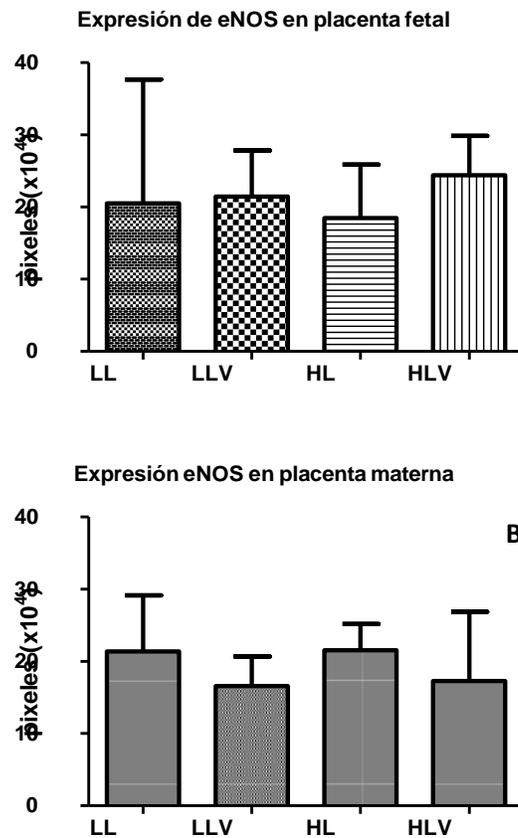


Fig. 2. A. Expresión de eNOS en placenta fetal de ovejas con 96-100 días de gestación, en preñeces desarrolladas a nivel del mar. **B.** Expresión de eNOS en placenta materna en ovejas con 96-100 días de gestación, en preñeces desarrolladas a nivel del mar. LL: ovejas originarias de una condición cercana a nivel del mar (n=5). LLV: ovejas originarias de una condición cercana a nivel del mar, con tratamiento antioxidante (n=5). HL: ovejas originarias de altura (n=5). HLV: ovejas originarias de altura, con tratamiento antioxidante (n=5).

Los resultados de la actividad de NOS dependiente de Ca^{+2} , obtenidos por el método de conversión de ^3H -arginina a ^3H -citrulina, se muestran en la figura 3. El análisis estadístico no reveló diferencias significativas entre los grupos, ya sea para placenta fetal como para placenta materna.

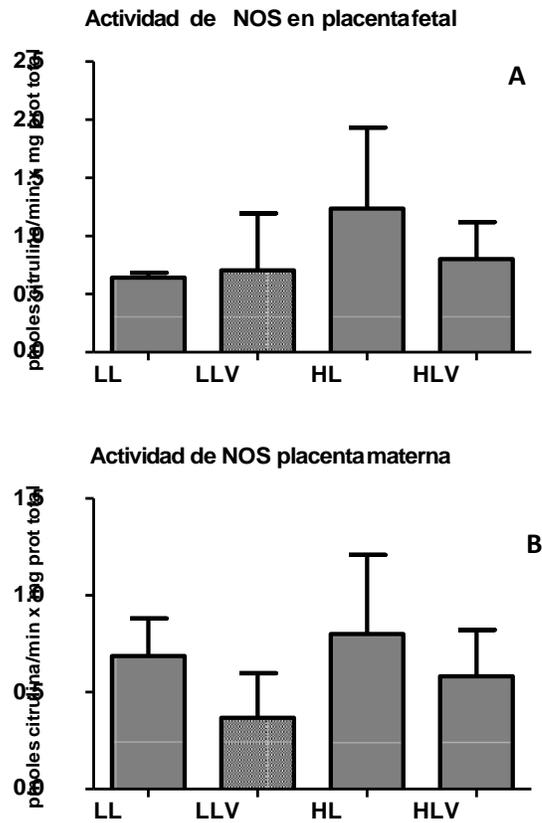


Fig. 3. A. Actividad de NOS en placenta fetal de ovejas con 96-100 días de gestación, en preñeces desarrolladas a nivel del mar. **B.** Actividad de NOS en placenta materna en ovejas con 96-100 días de gestación, en preñeces desarrolladas a nivel del mar. LL: ovejas originarias de una condición cercana a nivel del mar (n=5). LLV: ovejas originarias de una condición cercana a nivel del mar, con tratamiento antioxidante (n=5). HL: ovejas originarias de altura (n=5). HLV: ovejas originarias de altura, con tratamiento antioxidante (n=5).

DISCUSIÓN

En la presente memoria de título se analizó si existían diferencias en la expresión de eNOS entre el compartimento materno y fetal, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos tratados con vitaminas ni entre grupos de distinta procedencia, altura o condición cercana a nivel del mar, para los 100 días de gestación.

Se utilizó una muestra de arteria umbilical como control positivo de eNOS de oveja, ya que esta isoenzima está ampliamente descrita en arterias de mamíferos, con una masa molecular correspondiente a 130 kDa; esta muestra fue analizada mediante *western blot* en las mismas condiciones que los homogeneizados de placenta ovina. Tanto el control positivo, como la muestra de placenta ovina entregaron una banda única de masa molecular de 140 kDa, coincidente con lo descrito para eNOS de mamíferos (Pérez, 2011). Dada la detección de bandas únicas, es factible modificar el protocolo de detección de eNOS en muestras de placenta ovina y utilizar la técnica *dot blot* en reemplazo de *western blot*.

Entre las ventajas del método *dot blot* se describen, la posibilidad de cargar un volumen mayor y trabajar un mayor número de muestras de forma simultánea.

Con el objeto de determinar la dilución óptima de anticuerpo primario, se probó un rango de diluciones que va desde 1:250 a 1:4000 para el anticuerpo anti-eNOS. Se llegó a un óptimo en una dilución de 1:250 (Pérez, 2011).

Mediante técnicas de inmunohistoquímica y *western blot*, Vagnoli y colaboradores (1998) encontraron expresión de eNOS en endotelio de arterias uterinas y sistémicas (renales, omentales y mamarias), no encontrando a su vez, expresión de la isoenzima inducible, en muestras ovinas. El mismo equipo de investigadores indicaron que en preñez aumenta la actividad específica de NOS en la arteria uterina, no así en la arteria omental; ellos reportaron que cerca del 90% de actividad de NOS es Ca^{+2}

dependiente, no encontrando presencia de la isoenzima neuronal trabajando con arterias uterinas y omental, utilizando las mismas técnicas en ovejas sometidas a similares condiciones.

Alegría (2010), mediante la técnica de inmunohistoquímica analizó, entre otras cosas, la presencia de eNOS, nNOS e iNOS en muestras de placenta de ovejas adaptadas a una condición de altura, no encontrando presencia de las isoenzimas neuronal ni inducible de la NOS. Por otra parte Pérez (2011), estudió la presencia de las isoenzimas nNOS e iNOS en placenta de ovejas gestantes mediante *western blot*, no encontrándose ninguna de estas isoenzimas en las muestras estudiadas; es por esto, que los procedimientos posteriores se centraron únicamente en la eNOS, pensando que las otras isoenzimas no se expresan en la placenta, o bien, lo hacen en tan baja cantidad que no fueron detectadas.

Las isoformas eNOS e iNOS se expresan en la placenta de distintas especies incluyendo la humana, mono Rhesus y oveja (Zarlingo *et al.*, 1997). Sin embargo, estudios más recientes hechos con técnicas de *western blot* e inmunolocalización en distintas estructuras de la placenta ovina durante preñez tardía (110-142 días), indicarían predominio de la isoforma endotelial (principalmente en endotelio vascular) sobre la inducible (principalmente en las células estromales de tejido intercotiledonario); esto se explicaría en parte por el hecho que en aquellas células que expresaron iNOS se presenta también inmunotinción para marcadores de linfocitos CD 14, lo que lleva a pensar en una función más bien de vigilancia y protección frente a patógenos, vía activación inmunológica y posterior respuesta citotóxica de NO (Zarlingo *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 2000). Además, los cambios en la expresión de proteína eNOS y producción de NO (nitrato y nitrito) en cotiledón ovino están asociados temporalmente con peso placentario, expresión de otros factores angiogénicos y densidad vascular (Zheng *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2005).

Kwon y colaboradores (2004a), trabajaron con el placentoma ovino intacto y a distintas edades gestacionales (30, 40, 60, 80, 100, 120 y 140 días) encontrando un primer *peak* de síntesis de NO al día 60 de gestación para placenta intercotiledonaria y placentomas, y en endometrio intercaruncular en los días 40 y 60 de gestación. También observaron un segundo máximo hacia el día 100 de gestación, cuando el flujo sanguíneo placentario fetal continúa incrementándose, para aumentar la transferencia de nutrientes y oxígeno al feto que se encuentra bajo rápido crecimiento. Ellos suponen, resumiendo experiencias relativas a densidad vascular, que el primer *peak* tendría un componente primariamente de tejido caruncular y el segundo aumento en la síntesis de NO, en las mediciones hechas los días 100, 120 y 140, un predominio cotiledonario; lo anterior concuerda con observaciones de Zheng y colaboradores, que en el año 2000 comunicaron una expresión aumentada de eNOS en el tejido cotiledonario ovino en los días 110, 120 y 130, resultado obtenido mediante *western blot*.

La enzima eNOS, ha demostrado distintos comportamientos dependiendo del tejido, especie y condiciones experimentales; incluso dentro de un mismo tejido exhibe características distintas. Por ejemplo, en el placentoma ovino, diversos estudios han demostrado distintos niveles de mRNA de eNOS según edad gestacional y compartimento analizado, cotiledón o carúncula (Ziebell *et al.*, 2007).

Por otra parte, Borowicz y colaboradores en el año 2007, midieron RNA mensajero de eNOS, los días 50, 70, 90, 110, 130 y 140 de gestación y observaron un *peak* de éste en el día 90 de gestación en el tejido caruncular de placentoma ovino; este aumento fue estadísticamente significativo en comparación a las otras edades gestacionales evaluadas, las cuales no sufrieron mayor variación. En este trabajo además se evaluó el RNA mensajero de la enzima guanilato ciclasa soluble, la cual cataliza la conversión de GTP en GMP cíclico, mecanismo mediante el cual NO regula el tono vasomotor. Esta enzima presentó una notoria alza hacia el día 140 de gestación, la cual también fue observada en territorio caruncular.

En esta memoria, se analizó la actividad de eNOS mediante el método de conversión de [³H]-arginina a [³H]-citrulina, encontrándose sólo actividad de NOS dependiente de Ca⁺² y calmodulina, siendo expresada como pmoles de citrulina formada por min/mg de proteína total. Estos valores no representan diferencias estadísticamente significativas, tanto para el compartimento materno como el fetal de la placenta

ovina, ni para la procedencia de las ovejas, en las condiciones anteriormente señaladas. Kwon y colaboradores (2004a), reportaron incrementos en la actividad de NOS medidos por el mismo método, en los días 30, 40 y 60 de gestación, disminuyendo hacia el día 80 e incrementándose de nuevo hacia el día 100, lo cual concuerda con las mediciones de síntesis de NO realizadas durante igual periodo.

Estos autores también establecieron la correlación positiva entre actividad NOS total, concentración de los cofactores BH₄ y NADPH, y la actividad de la enzima GTP- ciclohidrolasa, la cual es la enzima que controla la velocidad de síntesis *de novo* de BH₄. Lo anterior pone de manifiesto la importancia de contar con los cofactores y sustratos adecuados durante el estudio *in vitro*, aunque esto claramente no asegura igualar las condiciones que se dan *in vivo*, puesto que no participan los mecanismos regulatorios ni las vías metabólicas de los organismos en su entorno natural. Por ejemplo, L-citrulina puede ser reciclada a L-arginina vía argininosuccinato sintasa y liasa, virtualmente en todas las células animales (Kwon *et al.*, 2004b).

La síntesis placentaria de NO, así como poliaminas (otro producto del catabolismo de arginina, esencial para la angiogénesis y crecimiento) se incrementa marcadamente entre los días 30 y 60 de gestación, cuando el crecimiento placentario y desarrollo placentomal son más rápidos (Kwon *et al.*, 2003).

Estos hallazgos dan cuenta de la alta tasa de regulación que existe con respecto a las vías que utilizan arginina como sustrato y que la disponibilidad que se puede lograr *in vitro* para la reacción deseada, puede ser distinta a la que se da *in vivo*.

Del mismo modo, una serie de mecanismos transcripcionales y postranscripcionales regulan los niveles de expresión de la proteína eNOS. La enzima se asocia en forma reversible con una familia de proteínas que regulan su localización subcelular, función catalítica y actividad biológica. La actividad de eNOS y localización subcelular están controladas fuertemente por modificaciones postraduccionales que incluyen fosforilación, *S*-nitrosilación y acilación (Liu *et al.*, 2009). Estos autores, en un estudio de ovejas que fueron sometidas a hipoxia hipobárica prenatal, encontraron que en su vida adulta no cambiaban los niveles de expresión de proteína eNOS, con respecto a sus controles que se mantuvieron a nivel del mar (dato obtenido con muestras de arteria pulmonar). Por otra parte, la actividad de la enzima disminuyó significativamente en el grupo de ovejas con hipoxia prenatal. La explicación surge de los niveles de regulación postranscripcional de la enzima, ya que se observó que la unión de eNOS con caveolina-1 (proteína que al unirse compromete la habilidad de eNOS para unir calmodulina), aumentó en forma significativa y que, al contrario, la unión de eNOS con calmodulina y Hsp90 disminuyó notablemente.

Además Liu y colaboradores (2009), sugieren que la fosforilación o defosforilación de eNOS tendría que ver con el deterioro de la respuesta de arterias pulmonares de ovejas que sufrieron hipoxia prenatal, por cuanto observaron que la fosforilación de la serina-1177, que estimula la actividad de eNOS, se vio disminuída; y la fosforilación de treonina-495, que perjudica la unión de calmodulina a eNOS, se ve aumentada en forma significativa.

En la presente memoria se utilizaron dosis de vitamina C de 500 mg y 350 UI de vitamina E, desde aproximadamente 30 días antes del encaste, todos los días hasta la obtención de muestras el día 100 de gestación.

Parraguez y colaboradores (2011), utilizando las mismas raciones de vitaminas encontraron que, la suplementación con vitaminas antioxidantes en ovejas preñadas, en un grupo a nivel del mar, otro aclimatado a la altura y un tercero originario de

nivel del mar y trasladado a la altura, aumentaba el peso al nacimiento de sus crías; y que la concentración plasmática de estas vitaminas en las madres era 2 veces la presente en los grupos sin vitaminas. Además, la suplementación vitamínica revierte el estado de estrés oxidativo de las ovejas, medido como grupos carbonilos en plasma (indicador de oxidación de proteínas) y malondialdehído (indicativo de lipoperoxidación), en los grupos estudiados.

CONCLUSIONES

La eNOS en placentoma de ovejas se comporta de manera constitutiva, a los 100 días de gestación.

La actividad de NOS encontrada en ovejas con 100 días de gestación es muy probable que sea debido a la isoforma endotelial, ya que no se encontró actividad enzimática independiente de Ca^{+2} .

Tanto el tratamiento con vitaminas C+E como el origen de las ovejas no tienen efecto sobre la expresión y actividad de eNOS a los 100 días de gestación.

BIBLIOGRAFÍA

ALDERTON, W.K; COOPER, C.E.; KNOWLES, R.G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357: 593-615.

ALEGRÍA, D. 2009. Efectos de la terapia antioxidante sobre la expresión y localización lacentaria de VEGF, NOS y leptina en ovejas que cursan su gestación en hipoxia hipobárica. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 21 p.

BARRY, J.S.; ANTHONY, R.V. 2008. The pregnant sheep as a model for human pregnancy. *Theriogenology.* 69(1): 55-67.

BEALL., C.M. 2007. Two routes to functional adaptation: Tibetan and Andean high- altitude natives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104 (Supp1): 8655-8660.

BOROWICZ, P.P.; ARNOLD, D.R.; JOHNSON, M.L.; GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A.; REYNOLDS, L.P. 2007. Placental growth throughout the last two thirds of pregnancy in sheep: vascular development and angiogenic factor expression. *Biol. Reprod.* 76: 259-267.

BREDT, D.; SNYDER, S. 1990. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin- requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87(2): 682-685.

National Research Council, Committee on Animal Nutrition. 1985. Nutrient Requirements of Sheep. 6th ed. Washington, DC: National Acad Press; 45 p.

DAFF, S. 2010. NO synthase: Structures and mechanisms. *Nitric Oxide*. 23(1): 1-11.

DOSEK, A.; OHNO, H.; ACS, Z.; TAYLOR, A.W.; ZSOLT, R. 2007. High altitude and oxidative stress. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 158(2-3): 128–131.

ESCUDERO, C.; SOBREVIA, L. 2008. A hypothesis of preeclampsia: adenosine and inducible nitric oxide synthase in human placental microvascular endothelium. *Placenta* 29: 469-483.

FLEMING, I. 2010. Molecular mechanism underlying the activation of eNOS. *Pflugers. Arch.* 459(6): 793-806.

GALLEGUILLOS, M.A.; VALENZUELA, M.A.; RIQUELME, R.; SANHUEZA, E.; SÁNCHEZ, G.; FIGUEROA, J.P.; LLANOS, A.J. 2001. Nitric oxide synthase in brain tissues from llama fetuses submitted to hypoxemia. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 129(2-3): 605-614.

HELLER, R.; WERNER-FELMAYER, G.; WERNER, E.R. 2006. Antioxidants and endothelial nitric oxide synthesis. *Eur. J. Pharmacol.* 62(Suppl 13): 21-28.

HIGDON, J. V.; FREI B. 2002. Vitamin C: An Introduction. **In:** *The Antioxidant Vitamins C and E*. AOCS Press. Illinois, U.S.A. pp.1-16.

HILL, B.G.; DRANKA, B.P.; BAILEY, S.M.; LANCASTER, J.R. Jr; DARLEY-USMAR, V.M. 2010. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J. Biol. Chem.* 285(26): 19699-19704.

JENSEN, G.M.; MOORE, L.G. 1997. The effect of high altitude and other risk factors on birthweight: independent or interactive effects? *Am. J. Public. Health.* 87(6): 1003-1007.

JOYCE, J.M., PHERNETTON, T.M.; MAGNESS, R.R. 2002. Effect of uterine blood flow occlusion on shear stress-mediated nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase expression during ovine pregnancy. *Biol. Reprod.* 67(1): 320- 326.

KASIMANICKAM, R.K.; KASIMANICKAM, V.R.; RODRÍGUEZ, J.S.; PELZER, K.D.; SPONENBERG, P.D; THATCHER, C.D. 2010. Tocopherol induced angiogenesis in placental vascular network in late pregnant ewes. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 8: 86-97.

KOLLURU, G.K; SIAMWALA, J.H; CHATTERJEE, S. 2010. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie.* 92(9): 1186-1198.

KWON, H.; WU, G., BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. 2003. Developmental changes in polyamine levels and synthesis in the ovine conceptus. *Biol. Reprod.* 69(5): 1626-1634.

KWON, H.; WU, G., MEININGER, C.J., BAZER, F.W.; SPENCER, T.E. 2004a. Developmental changes in nitric oxide synthesis in ovine placenta. *Biol. Reprod.* 70(3): 679-686.

KWON, H; FORD S.P; BAZER, F.W.; SPENCER, T.E.; NATHANIELSZ, P.W.; NIJLAND, M.J.; HESS, B.W.; WU, G. 2004b. Maternal nutrient restriction reduces concentrations of amino acids and polyamines in ovine maternal and fetal plasma and fetal fluids. *Biol. Reprod.* 71(3): 901-908.

LI, H.; POULOS, T.L. 2005. Structure–function studies on nitric oxide synthases. *J. Inorg. Biochem.* 99(1): 293-305.

LI, Y.; ZHENG, J.; BIRD, I.M.; MAGNESS R.R. 2004. Mechanisms of shear stress-induced endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Biol. Reprod.* 70(3): 785–796.

LIU, J.; GAO, Y.; NEGASH, S.; LONGO, L.; RAJ, J.U. 2009. Long-term effects of prenatal hypoxia endothelium-dependent relaxation responses in pulmonary arteries of adult sheep. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 296: L547-L554.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, L.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193(1): 265-275.

MAGNESS, R.R.; SULLIVAN, J.A.; LI, Y.; PHERNETTON, T.M.; BIRD, I.M. 2001. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VI. Ovarian and pregnancy effects on eNOS and NO(x). *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280(4): H1692-H1698.

MONTEZANO, A.C.; TOUYZ, R.M. 2011. Reactive oxygen species and endothelial function-Role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. [En línea] *Basis. Clin. Pharmacol. Toxicol.*

<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-7843.2011.00785.x/pdf>> [Fecha de consulta: 28-10-2011]

MOORE, L.G; SHRIVER, M.; BEMIS, L.; HICKER, B.; WILSON, M.; BRUTSAERT, T.; PARRA, E.; VARGAS, E. 2004. Maternal adaptation to high- altitude pregnancy: An experiment of nature-A review. *Placenta.* 25: S60-S71.

MYATT, L.; CUI, X. 2004. Oxidative stress in the placenta. *Histochem. Cell. Biol.* 122: 369-382.

MYATT, L. 2010. Review: Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation of the placenta. *Placenta.* 24: S66-S69.

PACKER, L.; OBERMÜLLER-JEVIC, U.C. 2002. Vitamin E: An Introduction. **In:** *The Antioxidant Vitamins C and E.* AOCS Press. Illinois, U.S.A. pp. 133-151.

PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, M.; DÍAZ, R.; BRUZZONE, M. E.; BEHN, C.; RAGGI, L. A. 2005. Effect of hypobaric hypoxia on lamb intrauterine growth: comparison between high- and low-altitude native ewes. *Reprod. Fertil. Dev.* 17: 497-505.

PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, M.; DÍAZ, R.; CEPEDA, R.; GONZÁLEZ, C.; DE LOS REYES, M.; BRUZZONE, M. E.; BEHN, C.; RAGGI, L. A. 2006. Ovine placenta at high altitudes: Comparison of animals with different times of adaptation to hypoxic environment. *Anim. Reprod. Sci.* 95(1-2): 151-157.

PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, M.; ARANEDA, O.; GARCÍA, C.; MUÑOZ A.; DE LOS REYES, M.; URQUIETA, B. 2011. Effect 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.* 23(2): 285-296.

PENNINGA, L.; LONGO, L.D. 1998. Ovine placentoma morphology: effect of high altitude, long-term hypoxia. *Placenta.* 19(2-3): 187-193.

PÉREZ, G. 2011. Efecto del tratamiento antioxidante (vitaminas C+E) en ovejas gestantes en altura sobre la actividad y presencia de isoformas de óxido nítrico sintasa en tejido placentario. Memoria Título Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 45 p.

REYNOLDS, L.; BOROWICZ, P.; VONNAHME, K.; JOHNSON, M.; GRAZUL-BILSKA, A.; WALLACE, J.; CATON, J.; REDMER, D. 2005. Animal models of placental angiogenesis. *Placenta* 26(10): 689-708.

REYNOLDS, L.; BOROWICZ, P.; CATON, J.; VONNAHME, K.; LUTHER, J.; BUCHANAN, D.; HAFEZ, S.; GRAZUL-BILSKA, A.; REDMER, D. 2010. Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *Int. J. Dev. Biol.* 54(2-3):355-365.

SHEPPARD, C.; SHAW, C.E.; LI, Y.; BIRD, I.M.; MAGNESS, R.R. 2001. Endothelium-derived nitric oxide synthase protein expression in ovine placental arteries. *Biol. Reprod.* 64(5): 1494-1499.

SPRAGUE B.; CHESTER, N.C; MAGNESS, R.R. 2010. Shear stress regulation of nitric oxide production in uterine and placental artery endothelial cells: experimental studies and hemodynamic models of shear stresses on endothelial cells. *Int. J. Dev. Biol.* 54(2-3): 331-339.

VAGNONI, K.E; SHAW, C.E.; PHERNETTON, T.M; MEGLIN, B.M; BIRD, I.M; MAGNESS, R.R. 1998. Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. III. Ovarian and estrogen effects on NO synthase. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 275(5 Pt 2): H1845-H1856.

ZARLINGO, T.J; EIS, A.L; BROCKMAN, D.E.; KOSSENJANS, W.; MYATT, L. 1997. Comparative localization of endothelial and inducible nitric oxide synthase isoforms in haemochorial and epitheliochorial placentae. *Placenta*. 18(7): 511-520.

ZHENG, J.; LI, Y.; WEISS, A.R.; BIRD, I.M.; MAGNESS, R.R. 2000. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthases and nitric oxide production in ovine placental and uterine tissue during late pregnancy. *Placenta*. 21(5-6): 516-524.

ZHENG, J.; BIRD, I.M.; CHEN, D.B.; MAGNESS, R.R. 2005. Angiotensin II regulation of ovine fetoplacental artery endothelial function: interactions with nitric oxide. *J. Physiol*. 565(Pt 1): 59-69.

ZIEBELL BT, GALAN HL, ANTHONY RV, REGNAULT TR, PARKER TA, ARROYO JA. 2007. Ontogeny of endothelial nitric oxide synthase mRNA in an ovine model of fetal and placental growth restriction. *Am. J. Obstet. Gynecol*. 197(4): 420.e1-420.e5.

ANEXO