

MOTTA, CARLOS EUGENI
Sildenafil efecto



2013 72677

72677

MFN:
Clasif:
T. 029

72677



Creer... Crear... Crecer...

Universidad Nacional de Río Cuarto

SILDENAFIL: EFECTO SOBRE LA
VASCULARIZACIÓN Y EL ESTRÉS
OXIDATIVO EN UN MODELO DE
PRE-ECLAMPSIA.

TESIS DE MAESTRÍA

Med. Vet. Motta Carlos Eugenio

AÑO 2013

El presente trabajo para optar al grado de Magister en Anatomía y Fisiología Veterinaria fue realizado en el Departamento de Anatomía Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.



Magister. Med. Vet. Motta Carlos Eugenio.




Directora: Dra. M. Cristina Romanini.

Codirector: Dr. Claudio G. Barbeito.


Aprobado por el Jurado Evaluador de Tesis:



Dr. Ricardo E. Fretes



Dra. M. Carolina Grosso



Dra. M. Cecilia Merkis

AÑO 2013



Motta Carlos Eugenio

*Para Natalia
mi inspiración,
mi horizonte, mi vida*

AGRADECIMIENTOS

"Yo aprendí de mis maestros, que tienen la suerte de no saber que soy su alumno. Pero no hubiera escrito si no hubiera encontrado mi propia voz. Sin ellos, no podría haber encontrado mi propia voz".

Marcelo Birmajer

Quiero a agradecerle Dios por haberme dado la vida y el tiempo para llevar a cabo esta tesis y por haber puesto en mi camino a personas tan fascinantes que se convirtieron en mis maestros, muchas gracias.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por permitirme avanzar en mi formación profesional y llevar a cabo esta tesis.

A mi esposa, Natalia, la persona que me inspira, que me da fuerzas, que me alienta, que logra de mí una mejor persona y principalmente por elegirme para formar una familia. Te amo.

A mis padres, porque cuando era chico me decían algún día lo vas a entender, ¡tenían razón!, también porque me instigaron y enseñaron a pensar, pero sobre todo porque me permitieron volar.

A mis suegros, Eva y Carlos, gracias por confiarme una de las dos cosas más valiosas que poseían, su hija y por abrigarme como un hijo más.

A mis hermanas y esposos, Mariela y Martín, Romina y Gastón, María de los Ángeles, gracias por darme lo más maravilloso y deslumbrante de mi vida, los alumnos perfectos, mis sobrinos.

A mis sobrinos, Martina, Unai e Iker, gracias por hacerme reír, imaginar, correr, gritar, saltar, simplemente gracias por hacerme jugar. Cuantas cosas todavía nos quedan por aprender juntos.

A mi directora, Kity Romanini, por haber tenido la bondad de recibirme, la paciencia para escucharme y la luz para guiarme.

A mi codirector, Claudio Barbeito, por su inmensa sabiduría e infinita humildad y por su inconmensurable tiempo dedicado a mi formación profesional.

Al Dr. Ricardo Fretes, la Dra. Cecilia Merkis y la Dra. Carolina Grosso los Jurados, por su dedicación desinteresada a la corrección de esta tesis.

A la Dra. Adriana Vivas, por confiar en mí, darme la oportunidad para realizar esta tesis y por la lucha para que se concrete.

A Fabricio, por su incondicional vocación de ayuda y por prestarme su oído, como voy a extrañar las sesiones de Hilux-terapia!

A Romina, por hacerme pensar, mostrarme la otra cara de la moneda y enseñarme a hacer un análisis introspectivo de mi trabajo.

A Carolina, por sus entrañables correcciones, por su dedicación en la evaluación de mi método científico y sobre todo por enseñarme a aceptar la imagen del espejo.

A Lujan, Leo y Pablo, por su paciencia y su apoyo, gracias por equilibrar la balanza y demostrarme que el mundo no es un laboratorio.

A Lucila, Daniela y Verona, por soportar mi locura con TBARS y por compartir sus hermosas cualidades.

Al Dr. Fernando Maneas, por su paciencia para enseñarme las técnicas de estrés oxidativo, contestar mis dudas y principalmente gracias por compartir tus conocimientos sin esperar algo a cambio.

A Dra. Carlina Zanuzzi, por el tiempo y el trabajo dedicado.

A Nelcy Schleef, por esa exquisita habilidad para hacer cortes histológicos y hacer posible lograr las imágenes que imaginaba.

A los integrantes del bioterio de la facultad de Ciencias Exactas por su dedicación en el cuidado ameno de los animales.

A mis compañeros del Dpto. de Patología Animal, Ana, Hernán, Guille, Vivian, Karina, Lala, Laura, Mecha y Rubén, por su apoyo y comprensión. ¡Gracias por educarme en la docencia!

A Armando, Pepe, Ceci, Julieta, Emiliano, Irina, Ignacio, Ezequiel, Cristina y Jeremías porque no solo me brindaron su amistad, sino que me abrieron las puertas de sus casas y me permitieron formar parte de su familia.

A Jorge, Mati, Nadia, Pablo, Enzo, Julián y Juan Pablo, por haber sido mis alumnos, mis compañeros, mis profesores, mis colegas.

A mis alumnos y voluntarios con los que compartí muchas tardes aprendiendo y que me demostraron que el futuro está en buenas manos.

A todas las personas que participaron que de alguna u otra forma colaboraron de este trabajo.



¡Gracias a todos por su amistad!

Los contenidos de esta tesis fueron presentados en:

Publicaciones de resúmenes en revistas:

“Effect of sildenafil on L-nitroarginine methyl ester (L-NAME) preeclampsia-like induced mouse model”. 2013. Autores: Motta CE, Grosso MC, Zanuzzi CN, Picco NY, Bellingeri RV, Alustiza FE, Vivas AB, Romanini MC, Barbeito CG. *Placenta* 34 (A40) . ISSN: 0143-4004.

“Sildenafil and l-name: effects on placental efficiency in mice. Preliminary results”. 2011. Autores: Motta C, Picco N, Alustiza F, Grosso C, Bellingeri R, Busso L, Molinero D, Vivas A, Romanini M. *Biocell* 35 (3): A298. ISSN 0327-9545 (impreso). ISSN 1667-5746 (electrónico).

Presentaciones en Congresos, Jornadas y Simposios

“5th Latin American Symposium on Maternal Fetal Interaction and Placenta”, en Foz de Iguazú (Brasil), 2013. Modalidad: Presentación de póster: “Effect of sildenafil on L-nitroarginine methyl ester (L-NAME) preeclampsia-like induced mouse model”. Autores: Motta C, Grosso MC, Zanuzzi C, Picco N, Bellingeri R, Alustiza F, Vivas A, Romanini MC, Barbeito C.

“Primer Congreso Virtual de Ciencias Morfológicas” en Ciudad de La Habana (Cuba), 2012. Modalidad: Presentación de trabajo libre: “Sildenafil, efecto sobre el desarrollo de la placenta en un modelo murino de pre-eclampsia: resultados preliminares”. Autores: Motta C, Zanuzzi C, Grosso MC, Picco N, Bellingeri R, Alustiza F, Vivas A, Romanini MC, Barbeito C.

II Reunión Conjunta de las Sociedades de Biología de la República Argentina, en San Juan (Argentina), 2011. Modalidad: Presentación de poster: “Sildenafil y L-NAME: efectos sobre la eficiencia placentaria en ratones. Resultados preliminares”. Motta C, Picco N, Alustiza F, Grosso MC, Bellingeri R, Busso L, Molinero D, Vivas A, Romanini MC.

V Jornada Científico-Técnica de la Facultad de Agronomía y Veterinaria, en Río Cuarto, (Argentina), 2011. Modalidad: Presentación de poster: “Sildenafil, efecto sobre la eficiencia placentaria en ratones. Resultados Preliminares”. Motta C, Romanini M, Vivas A. Fac.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Índice de contenido	I
Índice de tablas.....	IV
Índice de figuras.....	V
Abreviaturas	VII
Resumen.....	VIII
Abstract.....	IX
INTRODUCCION	2
<i>Placentación.....</i>	<i>2</i>
<i>Óxido nítrico (NO).....</i>	<i>8</i>
<i>Estrés Oxidativo</i>	<i>11</i>
<i>Pre-eclampsia.....</i>	<i>13</i>
<i>L-NITROARGININA METIL ÉSTER (L-NAME).....</i>	<i>16</i>
<i>Sildenafil.....</i>	<i>17</i>
HIPOTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
<i>OBJETIVOS ESPECIFICOS.....</i>	<i>20</i>
MATERIALES Y MÉTODOS	22
<i>Animales</i>	<i>22</i>
<i>Modelo experimental.....</i>	<i>23</i>
<i>Grupos experimentales.....</i>	<i>23</i>
<i>Obtención de muestras</i>	<i>24</i>
<i>Análisis morfológico.....</i>	<i>25</i>

Número de embriones, Peso fetal y Peso placentario	27
Longitudes y diámetros fetales	28
Diámetros y altura placentaria	28
Eficiencia placentaria.....	28
<i>Técnicas implementadas.....</i>	<i>29</i>
Homogenatos placentarios y fetales.....	29
Concentración de Proteínas totales	31
Estrés oxidativo.....	33
Daño oxidativo a lípidos.....	33
Actividad de enzimas antioxidantes.....	37
Histología / Histopatología.....	39
Coloración de Hematoxilina/Eosina	39
Lectinhistoquímica.....	39
<i>Obtención y análisis de Imágenes</i>	<i>40</i>
<i>Estadística</i>	<i>41</i>
RESULTADOS	44
<i>Análisis Morfométrico.....</i>	<i>44</i>
Número de embriones, Peso fetal y Peso placentario	45
Longitudes y diámetros fetales	45
Diámetros y Altura placentaria	46
Eficiencia placentaria.....	47
<i>Técnicas implementadas.....</i>	<i>48</i>
Estrés oxidativo.....	48
Daño oxidativo a lípidos.....	48
Actividad de enzimas antioxidantes.....	48
Histología / Histopatología.....	50
Coloración de Hematoxilina/Eosina	50
Lectinhistoquímica.....	51
DISCUSIÓN	54

CONCLUSIONES.....	61
Bibliografía	63
Anexo I	70
<i>Buffers para Estres Oxidativo</i>	<i>70</i>
Materiales.....	70
Anexo II.....	71
<i>Protocolo Método de Bradford. Medición de proteínas.....</i>	<i>71</i>
Reactivo de Bradford	71
Curva y dosaje de proteínas	71
Anexo III	73
<i>Protocolo Daño oxidativo a lípidos Técnica de TBARS.....</i>	<i>73</i>
Soluciones	73
Curva patrón.....	73
Determinación.....	74
Anexo IV	75
<i>Procolo de Lectinhistoquímica con lectina BS-I en placenta.....</i>	<i>75</i>
Macros para valorar el porcentaje de marcación con Lectinhistoquímica.....	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Ejemplo de una curva patrón obtenido por el método de Bradford.	31
Tabla 2: Ejemplo de curva patrón de TBARS.	35
Tabla 3: Ejemplo de curva patrón de la actividad de la catalasa.....	38
Tabla 4: Número de fetos, peso fetal y peso de la placenta de los diferentes grupos de estudio.....	45
Tabla 5: Valores promedios de las longitudes y diámetros fetales	46
Tabla 6: Valores promedios de los diámetros placentarios.....	46
Tabla 7: Comparación de la eficiencia placentaria entre los distintos grupos de estudio	47
Tabla 8: Comparación de la peroxidación lipídica entre los distintos grupos de estudio	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Desarrollo y estructura de la placenta de ratón	3
Figura 2: Comparación de la estructura de la placenta del ratón y del humano	4
Figura 3: Representación esquemática de la placenta humana y de la placenta murina...	6
Figura 4: Angiogénesis de la placenta en una preñez normal.....	7
Figura 5: Vías de señalización inducida por VEGF.....	10
Figura 6: Proceso oxidativo de isquemia-reperfusión y acción antioxidantes.....	12
Figura 7: Invasión del trofoblasto y remodelación de la arteria espiral.....	14
Figura 8: Alojamiento y determinación del peso.....	22
Figura 9: Esquemmatización del modelo experimental.....	24
Figura 10: Necropsia y observación macroscópica del útero.....	25
Figura 11: Porción uterina que contiene una vesícula embrionaria.....	25
Figura 12: Análisis morfométrico de los fetos y placenta.....	26
Figura 13: Foto de placenta murina de 17 días de gestación sin membranas fetales.....	28
Figura 14: Proceso para lograr los homogenatos de las muestras.....	30
Figura 15: Curva patrón de Bradford.....	32
Figura 16: Esquema de la reacción entre MDA y TBA.....	33
Figura 17: Curva patrón para calcular la cantidad de MDA.....	34
Figura 18: Curva patrón de TBARS	35
Figura 19: Reacción catalizada por la enzima catalasa.....	37
Figura 20: Curva patrón para la determinación de catalasa.....	38
Figura 21: Ejemplo de fotomontaje de una placenta de roedor (H&E 40x).....	41
Figura 22: Imágenes de corte histológico del laberinto placentario	41
Figura 23: Útero de ratón, de 17 días de gestación.....	44

Figura 24: Comparación de la altura placentaria promedio	47
Figura 25: Comparación de la concentración de la enzima catalasa	49
Figura 26: Imágenes de corte histológico del laberinto placentario	50
Figura 27: Imágenes histológicas del laberinto placentario marcado con lectina BS-I. .	51
Figura 28: Porcentaje de área marcada con lectina BS-I.	52

ABREVIATURAS

5-PDE: 5-fosfodiesterasa.

Akt/PKB: proteína quinasa B.

ATP: adenosina-5-trifosfato.

B2R: receptor de bradiquinina tipo 2.

BK: bradiquinina.

Ca⁺²/CaM: complejo calcio/calmodulina.

DAB: 3,3'-diaminobenzidina.

eNOS: oxido nítrico sintetasa endotelial.

ERO: especies reactivas del oxígeno.

GMPc: monofosfato guanosina cíclico.

H₂O₂: peróxido de hidrogeno.

HCl: ácido clorhídrico.

iNOS: oxido nítrico sintetasa inducible.

IUGR: restricción del crecimiento intrauterino.

L-NAME: L-nitroarginina metil ester.

MDA: malondialdehído.

nNOS: oxido nítrico sintetasa neuronal.

NO: óxido nítrico.

NOS: óxido nítrico sintetasa.

OH: oxhidrilo.

PBS: solución salina tamponada con fosfato.

PIGF: factor de crecimiento placentario.

PKC: proteína quinasa C.

SOD: superóxido dismutasa.

TBA: ácido 2-tiobarbitúrico.

TBARS: especies reactivas al ácido tiobarbitúrico.

TCA: ácido tricloroacético.

TMP: Tetrametozipropano.

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.

VEGFR-1 o Flt-1: receptor tirosina quinasa 1.

VEGFR-2 o KDR: receptor tirosina quinasa 2.

RESUMEN

La pre-eclampsia es una enfermedad sistémica caracterizada por la aparición súbita de hipertensión y proteinuria después de la semana 20 de gestación en una mujer previamente normotensa y sin proteinuria. Estos cambios patológicos a menudo se asocian con restricción del crecimiento intrauterino (IUGR). La administración de L-nitroarginina metil éster (L-NAME), un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa (NOS), en ratones gestantes provoca cambios similares a los descritos en mujeres con pre-eclampsia. El sildenafil es un inhibidor selectivo de la 5-fosfodiesterasa; esta enzima previene la degradación de monofosfato guanosina cíclico (GMPc) y aumenta los efectos vasodilatadores del óxido nítrico (NO) en el músculo liso vascular. A partir de estos antecedentes se propone que el uso de sildenafil podría aumentar los efectos vasodilatadores y angiogénicos de NO, y por lo tanto podría reducir los cambios patológicos reportados en la pre-eclampsia. Para evaluar el efecto de la terapia con sildenafil en el modelo murino de pre-eclampsia se utilizaron veinte ratones, divididos en 4 grupos: 1) vehículo, 2) L-NAME; 3) sildenafil, 4) L-NAME + sildenafil. A partir del día 7 de gestación se administró el L-NAME y desde el día 8 el sildenafil, ambos tratamientos se continuaron hasta el día 16. Los animales fueron sacrificados en el día 17. Se midió el tamaño y peso de la placenta y del feto, se determinaron los niveles de peróxido lipídico y la actividad de la catalasa en homogenatos de placenta, y por lectinohistoquímica (utilizando la lectina BS-I) se identificó el endotelio vascular placentario. Para cuantificar el área marcada con lectina BS-I se realizó un análisis digital de imágenes usando el programa Image J 1,46. Los datos se analizaron mediante ANOVA de doble vía y se realizó test DGC como prueba *a posteriori*. No se evidenciaron cambios en el desarrollo placentario o fetal, en ratones con gestaciones normales tratados con sildenafil. El tratamiento con L-NAME redujo el peso placentario, el peso fetal, la superficie placentaria, y el porcentaje de la superficie endotelial, y aumento los niveles de los peróxidos de lípidos. Estas alteraciones pueden estar mediadas por la reducción de los niveles de NO en las células trofoblásticas, debido al efecto inhibidor de L-NAME sobre la síntesis de NOS. Este efecto fue compensado por el tratamiento con sildenafil, observándose un aumento del porcentaje de la superficie endotelial y el peso fetal, y una disminución de los peróxidos de lípidos.

ABSTRACT

Preeclampsia is a systemic disorder characterized by abrupt onset of hypertension and proteinuria after 20 weeks of pregnancy in a previously normotensive and non-proteinuric woman. These pathological changes are often associated with intrauterine growth restriction (IUGR). Administration of L-nitroarginine methyl ester (L-NAME), an inhibitor of nitric oxide synthetase (NOS), in pregnant mice causes similar changes to those described in women with preeclampsia. sildenafil is a selective inhibitor of phosphodiesterase 5; this enzyme prevents the degradation of guanine cyclic monophosphate (GMPc) and increases the vasodilatory effects of nitric oxide (NO) on vascular smooth muscle. The use of sildenafil may increase the vasodilatory and angiogenic effects of NO, and thus it may reduce the pathological changes reported in preeclampsia. To evaluate the effect of sildenafil therapy in a rodent model of preeclampsia was used twenty pregnant mice, divided into 4 groups: 1) Vehicle; 2) L-NAME; 3) sildenafil; 4) L-NAME + sildenafil. L-NAME was administered from day 7 of gestation and sildenafil from day 8, repeat both treatment until day 16. The animals were sacrificed on day 17. Placental and Fetal size and weights were measured; lipid peroxide levels and catalase activity in placental homogenates were determined, and placental vascular endothelia were identified by lectin-histochemistry using BS-I lectin. The quantification of lectin BS-I area was performed by digital image analysis using the program Image J 1.46. Data were analyzed by two-way ANOVA followed by DGC post-hoc test. No changes were seen in placental and fetal development in mice with normal pregnancies treated with sildenafil. Treatments with L-NAME reduced significantly the placental and fetal weight, placental surface and the percentage of the endothelial surface, and increase the levels of lipid peroxides and the percentage of the endothelial area. These alterations may be mediated by the reduction of NO levels in trophoblastic cells, due to the inhibitory effect of L-NAME on NOS synthesis. This effect was offset by the treatment with sildenafil, with an increase in the percentage of the endothelial surface and fetal weight, and a decrease of lipid peroxides.



Motta Carlos Eugenio

“Sorprendernos por algo es el primer paso de la
mente hacia el descubrimiento”.

Louis Pasteur

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCION

PLACENTACIÓN

El normal desarrollo del tejido placentario en los mamíferos es crucial para favorecer el crecimiento embrionario, proceso que requiere de mecanismos moleculares complejos y especializados.

La implantación es el proceso por el cual el concepto entra en contacto íntimo con el endometrio, de esta forma la madre podrá proporcionar sustancias nutritivas al embrión desarrollo. Aunque la naturaleza exacta de la implantación pueda variar considerablemente entre las especies de mamíferos, siempre se inicia con la aposición del blastocito al epitelio luminal del endometrio y culmina con la formación de la placenta definitiva (Bany *et al.*, 2006).

La placenta integra la interfase materno-fetal, participando en el intercambio de nutrientes y gases, en la excreción de los productos de desecho hacia la sangre materna, en la modulación inmunológica previniendo el rechazo materno por las diferencias genéticas del embrión y en la regulación endocrina (Soares *et al.*, 1998; Myatt *et al.*, 2010).

El desarrollo de la placenta requiere de una compleja regulación de la proliferación y diferenciación de las células del trofoblasto, las mismas invaden el epitelio luminal uterino colonizando el endometrio y su vasculatura (Pringle *et al.*, 2010). En algunas especies, durante la preñez el estroma del endometrio prolifera y forma la decidua, fundamental para la interacción materno-fetal (Suzuki *et al.*, 2009). En humanos y roedores, la decidualización ocurre en la preñez temprana, cuando las células estromales del endometrio, proliferan transitoriamente y luego se diferencian en grandes células poliploides deciduales. La implantación de los conceptos en los roedores estimula la decidualización en un tiempo y espacio específico. Esto comienza en la región anti-mesometrial, adyacente al concepto, para formar la zona decidual primaria. Luego se extiende a través de la mayor parte del área antimesometrial restante, formando la zona

decidual secundaria. Finalmente, la decidualización comienza en el área mesometrial del endometrio y allí se forma la placenta definitiva (Bany *et al.*, 2006).

La placenta murina es similar a la de humanos en muchos aspectos. Ambas son de forma discoide y hemocorial debido a que las interacciones feto-maternas entre las dos circulaciones sanguíneas implican la interacción física directa entre la sangre materna y trofoblasto coriónico. El laberinto de la placenta de los roedores se construye como un laberinto de muros, que representan la interface entre la circulación materna y fetal en la placenta. En el ratón, la placenta madura se establece alrededor del día 10 de gestación y se compone de tres capas principales: una capa externa de células gigantes trofoblásticas, una capa media denominada espongiotrofoblasto (a veces también denominada zona de unión) y el laberinto que es la capa más interna. Dentro del laberinto, los espacios de sangre materna son extremadamente estrechos y la sangre parece filtrarse a través del laberinto para regresar por medio de pequeños canales en el espongiotrofoblasto (Cross *et al.*, 2002) (Figura 1).

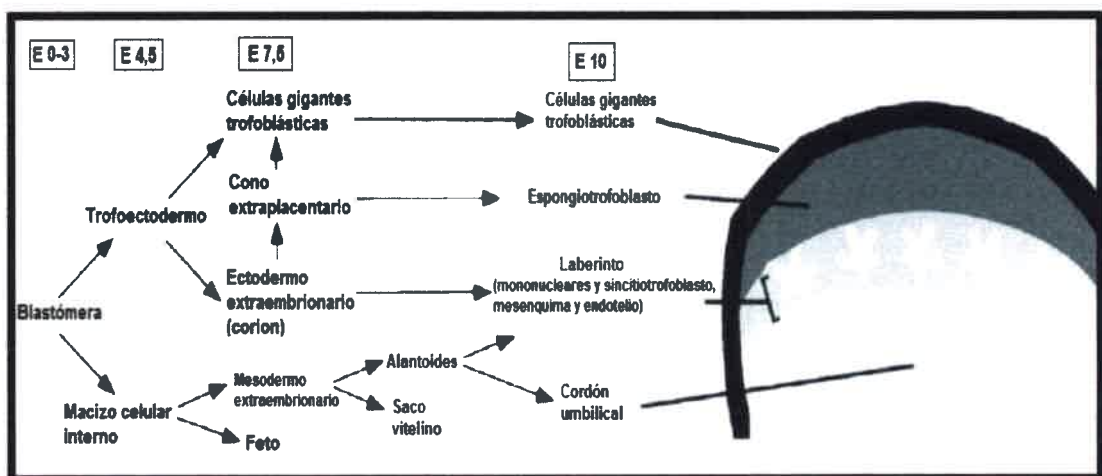


Figura 1: Desarrollo y estructura de la placenta de ratón.

Tipos celulares presentes en el concepto en diferentes días del desarrollo embrionario (E), se muestran en el contexto de sus orígenes evolutivos y su localización en las diferentes capas anatómicas de la placenta (Cross *et al.*, 2002).

La ultraestructura del laberinto en ratones, tiene un aspecto diferente a la del ser humano. La porción trofoblástica de la interface en el ratón se compone de tres capas, en contraste con una simple capa de sincitiotrofoblasto que posee el ser humano. En este

sentido, la placenta humana se dice que es hemomonocorial, mientras que la de los ratones es hemotricorial (Georgiades *et al.*, 2002).

Las tres capas de la porción trofoblástica de la interface en ratones se denominan I, II y III, siendo la capa I contigua a los espacios de sangre materna. La capa I está formada por células gigantes trofoblásticas discontinuas, altamente permeable a los solutos de peso molecular más pequeños. La capa II es denominada espongiotrofoblasto. Por último, la capa III, designada como laberinto placentario, es sincitial, representa la barrera inicial al intercambio materno-fetal y se encuentra formada por sincitiotrofoblasto, trofoblasto corionico, vasos sanguíneos y estroma (Figura 1 y 2). Aunque hay diferencias en el número de capas trofoblásticas entre las especies, los estudios de localización sugieren que hay similitudes entre las membranas específicas en humanos y ratón (Dilworth *et al.*, 2013).

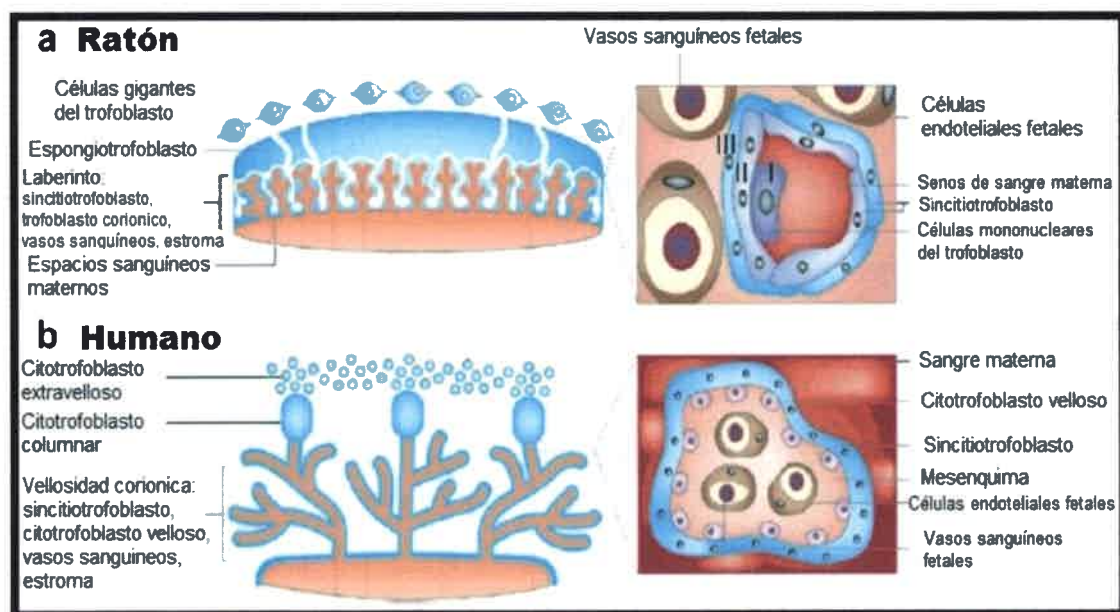


Figura 2: Comparación de la estructura de la placenta del ratón y del humano.

(a) Estructura de la placenta del ratón incluido el espongiotrofoblasto (zona de unión) y del laberinto. Detalles de la interfase materno-fetal en el laberinto. Se observan las tres capas trofoblásticas, capa I (capa de células mononucleares del trofoblasto), capas II y III (sincitiotrofoblasto). (b) Estructura de la placenta humana. En la imagen se observa un corte transversal de una vellosidad corionica; estructuras derivadas del trofoblasto (azul) y los tejidos derivados del mesodermo (naranja). Las imágenes en los recuadros ilustran el número y tipo de capas de células entre la sangre materna y fetal (Dilworth *et al.*, 2013).

La arteria central materna del útero de los ratones experimenta cambios similares a las modificaciones fisiológicas observados durante la preñez en las arterias espirales de humanos, aunque el tiempo de invasión del intersticio trofoblástico es significativamente diferente. El lecho placentario humano contiene aproximadamente 100-150 arterias espirales maternas y muchas venas maternas que se continúan con los canales vasculares de la placa basal y a través del cual fluye la sangre materna dentro y fuera del espacio intervelloso. Inicialmente, todos estos vasos sanguíneos maternos tienen paredes vasculares intactas y las venas funcionan de manera más o menos paralela a la placa basal, mientras que las arterias espirales corren aproximadamente perpendiculares a la misma. Una situación similar existe en la decidua basal de los ratones, excepto por el hecho de que por lo general contiene una (a veces dos o tres) arteria materna de localización central y numerosas venas maternas de localización más periférica. La transformación de la pared de la arteria central materna en ratones es análogo a los cambios fisiológicos de las arterias espirales en humanos (Georgiades *et al.*, 2002) (Figura 3).

En el ser humano, el citotrofoblasto endovascular invade y tapona inicialmente a las arteriolas espirales uterinas, por lo que hay poco o ningún flujo de sangre materna en el espacio intervelloso. Paradójicamente, a pesar de que el oxígeno durante la gestación tardía es esencial para la función de la placenta y para el crecimiento fetal, durante la gestación temprana la placenta y el embrión se diferencian en un entorno con una concentración de oxígeno relativamente baja. Sin embargo, alrededor de la semana 11 de gestación los tapones trofoblásticos de las arteriolas son desplazados y comienza el flujo de sangre materna (Figura 4). El citotrofoblasto endovascular extravelloso reemplaza el endotelio materno y remodela las arteriolas espirales, aumentando dramáticamente el diámetro y anulando la respuesta a las moléculas vasoactivas en la circulación materna. Esta expansión del árbol vascular uterino, que lleva a un aumento de 12 veces en el flujo sanguíneo uterino comparado con el de una mujer no embarazada, le permite a la placenta responder a las demandas del feto durante su crecimiento en la gestación tardía (Pringle *et al.*, 2010).

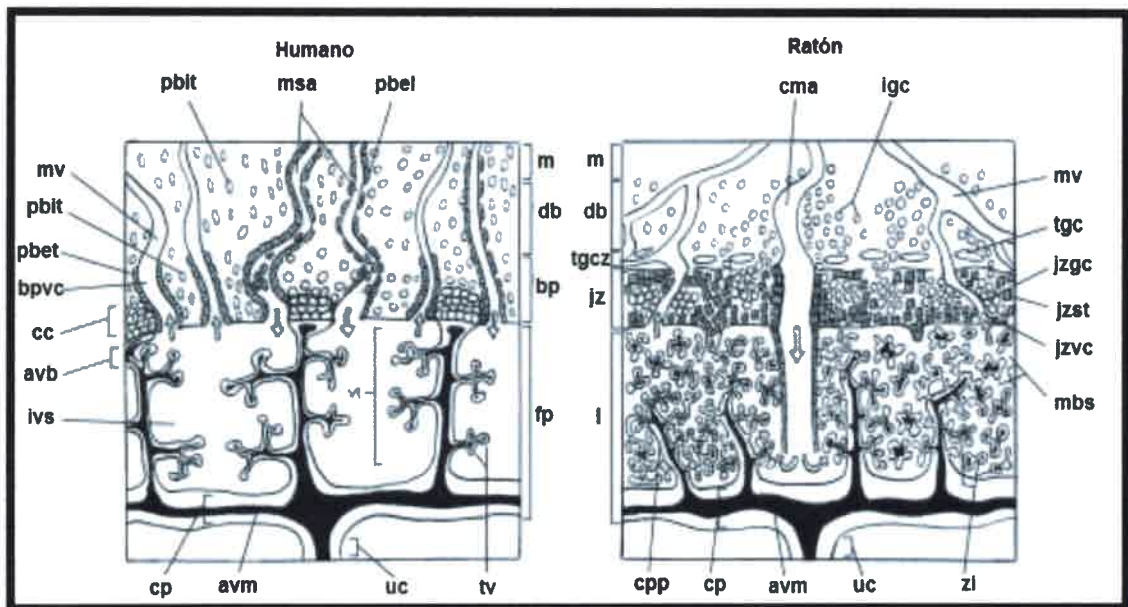


Figura 3: Representación esquemática de las principales regiones y de algunos tipos de células de la placenta humana y de la placenta murina durante el tercer trimestre y el último quinto de la gestación, respectivamente. Sección transversal con el plano de corte perpendicular a la superficie plana (fetal) de la placenta. El lado de la placenta más cercano al útero (lado materno) es en la parte superior de la imagen y el lado frente al feto (lado fetal) es la parte inferior. Una manera de diferenciar la extensión de la placa basal (bp) de la placenta humana es medir el trofoblasto endovascular que recubre la luz de las venas maternas (mv). A pesar de que es imposible mostrar en dos dimensiones, las regiones de la zona íntima (zi) del laberinto murino (l) son en realidad ramificaciones del laberinto de los principales salientes de la placa coriónica (cpp). En ambas especies, los canales venosos y arteriales de la zona de unión (jz) y la placa basal (pb) están revestidos por trofoblasto endovascular. Lo mismo se aplica a la parte laberíntica de la arteria central materna murina (cma). Las flechas muestran la dirección del flujo de la sangre materna dentro de la circulación útero-placentaria. *avb*, ramificación de la vellosidad de anclaje; *avm*, vasculatura alantoide y el mesénquima; *bp*, placa basal; *bpet*, placa basal del trofoblasto endovascular; *bpit*, placa basal del trofoblasto intersticial; *bpvc*, canal venoso de la placa basal; *cc* columna de células citotrofoblástica; *cma*, arteria central materna; *cp*, placa coriónica; *cpp*, proyección de la placa coriónica; *db*, decidua basal; *fp*, placenta fetal; *igc*, invasión de las células glicogénicas del trofoblasto; *ivs*, espacio intervelloso; *jz*, zona de unión; *jzgc*, zona de unión de las células glicogénicas del trofoblasto; *jzst*, zona unión del espongioblastos; *jzvc*, zona unión de los canales venosos; *l*, laberinto; *m*, miometrio; *mbs*, espacios de sangre materna; *msa*, arterias espirales maternas, *mv*, venas maternas; *pbit*, lecho intersticial placentario del trofoblasto invasivo; *pbet*, lecho endovascular placentario del trofoblasto; *tgc*, células trofoblásticas gigantes; *tgcz*, zona de células gigantes del trofoblasto, *tv*, vellosidades terminales; *uc*, cordón umbilical, *vt*, árbol velloso; *zi*, zona íntima (Georgiades *et al.*, 2002).

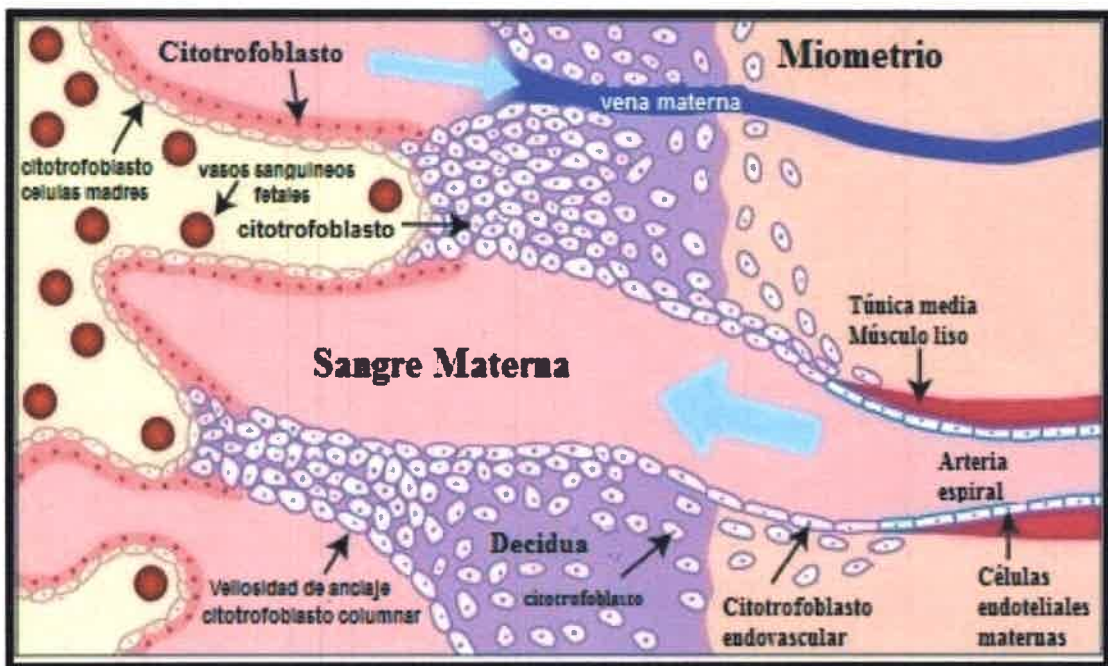


Figura 4: Angiogénesis de la placenta en una preñez normal.

Invasión del trofoblasto y remodelación de la arteria espiral en una preñez normal (Everett *et al.*, 2012).

La hipoxia es un regulador clave y está implicada en la morfogénesis y función de la placenta. En un embarazo normal un ambiente con poco oxígeno es fisiológico en la placenta y necesario durante el primer trimestre de la gestación, pero si se produce en la gestación tardía se convierte en patológico y se asocia con complicaciones comunes del embarazo (Pringle *et al.*, 2010).

La función de la placenta definitiva se establece cuando todos los factores fisiológicos necesarios para el intercambio entre la circulación materna y fetal están presentes. En los seres humanos, esto se cree que ocurre al final del primer trimestre de gestación. En ratones se observó una temporización similar en el establecimiento de la circulación uteroplacentario. La sangre materna es evidente en el laberinto recién al día 10,5 de gestación. Sin embargo, la amplia formación de capilares del feto (y por lo tanto el establecimiento de zona íntima) se observó alrededor del día 12,5 de gestación. Esto sugiere que la placenta definitiva del ratón se convierte en funcional poco después de mitad de la gestación o antes del día 12,5 de gestación (Georgiades *et al.*, 2002).

ÓXIDO NITRICO (NO)

Los vasos placentarios fetales no poseen inervación, por lo tanto la vasodilatación ocurre por el aumento de la producción de vasodilatadores locales. El NO podría ser el vasodilatador placentario de origen fetal más importante, no solo porque su producción es constitutiva sino además porque aumenta drásticamente su síntesis cuando es estimulado por el estrés agudo, con lo que se incrementa el flujo sanguíneo (Sprague *et al.*, 2010).

El NO es un radical libre sin carga, es un mensajero intercelular que regula una gran variedad de cambios fisiológicos y de procesos fisiopatológicos. Es un mensajero ubicuo que no sólo interviene en la homeostasis vascular, sino también en la neurotransmisión, en los sistemas inmunológicos y en la progresión de los tumores. Su función exacta depende de su distribución temporal y espacial, pero siempre es altamente reactivo y puede ser convertido a otras especies reactivas con gran rapidez, estas características hacen que sea muy difícil de detectar y de regular sus niveles *in vivo* (Hong *et al.*, 2009).

La formación del NO es catalizada por la enzima oxido nítrico sintetasa (NOS). Se identificaron tres isoformas de esta enzima: oxido nítrico sintetasa neuronal (nNOS o tipo I), oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS o tipo II) y la oxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS o tipo III) (Andronowska *et al.*, 2008). Durante la gestación se activan las enzimas NOS, a través de la vía de señalización del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), produciendo un aumento del NO, el cual potencia la acción del factor angiogénico y de esta manera se favorece la viabilidad embrionaria (Rivas *et al.*, 2006; Vonnahme *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005). El aumento de la producción de NO en úteros de rata durante la preñez es el resultado del incremento de expresión de iNOS (Suzuki *et al.*, 2009). La acción interrelacionada del VEGF, sus receptores tirosina quinasa (VEGFR-1 o Flt-1 y VEGFR-2 o KDR), eNOS y el receptor de bradiquinina tipo 2 (B2R), forman una red, que participa en la invasión del trofoblasto placentario y controlan la angiogénesis en forma autocrina / paracrina (Figura 5) (Valdes *et al.*, 2008). El VEGF activa la eNOS a través de distintas vías que incluyen: la proteína

quinasa B (Akt/PKB), el complejo calcio/calmodulina (Ca^{+2}/CaM) y la proteína quinasa C (PKC). El receptor Flt-1 puede regular negativamente al receptor KDR, pero también pueden promover su actividad. La bradiquinina (BK) estimula la eNOS a través de Ca^{+2} , e induce a las células endoteliales para formar estructuras tubulares, y transactiva al receptor KDR.

El NO posee importantes roles en la implantación, la deciduización, la vasodilatación de los vasos placentarios y uterinos, la relajación miométrial y participaría en la invasión vascular del trofoblasto (Ogando *et al.*, 2003). Además, es uno de los factores claves para la regulación de los cambios adaptativos que ocurren en los vasos sanguíneos uterinos y placentarios durante la preñez (Zhu *et al.*, 2005). Estudios realizados utilizando modelos animales demostraron que la inhibición prolongada del NO durante la preñez causa una restricción del crecimiento fetal, probablemente por una disminución del flujo sanguíneo fetal y uterino de la placenta (Sprague *et al.*, 2010). Los altos niveles de producción de NO en el miometrio en la mitad de la gestación son importantes para el mantenimiento de la preñez debido a que se inhibe la contracción del músculo liso. La región de mayor producción de NO uterino es la decidua (Suzuki *et al.*, 2009). La producción de NO por parte de las células endoteliales puede ser inducida o no por ligandos extracelulares que se unen a receptores endoteliales, pero cualquiera sea el mecanismo siempre se requiere de un incremento del calcio intracelular.

EL NO estimula la producción de monofosfato guanosa cíclico (GMPc), que promueve la relajación vascular por diferentes mecanismos. La duración de la acción del GMPc está controlada por la degradación del mismo, catalizada por una enzima citosólica, la 5-fosfodiesterasa (5-PDE). Esta enzima pertenece a una familia de isoenzimas que hidrolizan los nucleótidos cíclicos. En el músculo liso vascular, la forma predominante de la PDE presente es la 5-PDE específica de GMPc (Reyna-Villasmil *et al.*, 2008).

En animales se demostró que la liberación de NO puede conducir a la relajación del músculo liso a través de la vía mediada por el GMPc. Se han identificado inhibidores específicos de distintos subtipos de PDE, los cuales pueden aumentar los efectos de los nucleótidos cíclicos sobre el tejido blanco (Sher *et al.*, 2002).

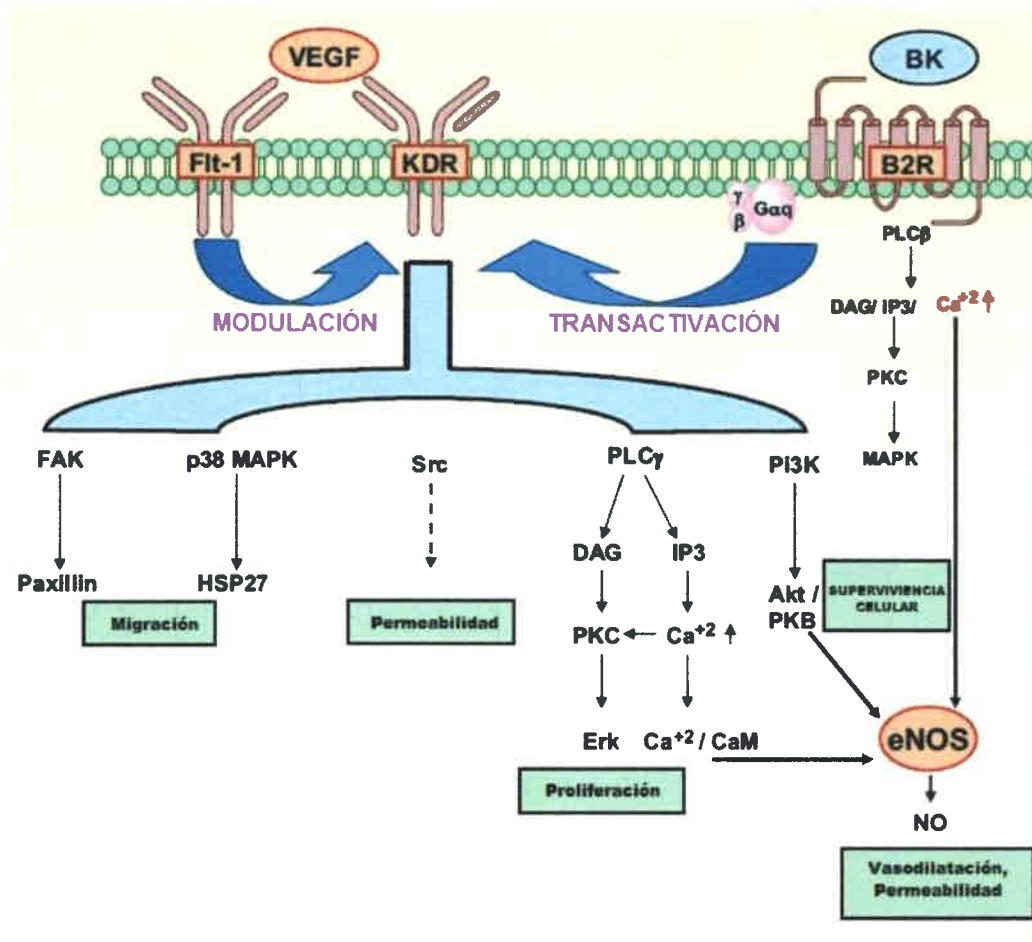


Figura 5: Vías de señalización inducida por VEGF, que contribuyen a la angiogénesis y al desarrollo de la interface útero-placentaria. *BK*: bradiquinina; *eNOS*: óxido nítrico sintetasa endotelial; *PLCβ*, fosfolipasa C-β; *PLCγ*: fosfolipasa C-γ; *DAG*: diacilglicerol; *IP3*: inositol (1,4,5)-trifosfato; *PKC*: proteína quinasa C; *MAPK*: proteína quinasa activada por mitógenos; *FAK*: quinasa de adhesión focal; *PI3K*, fosfoinositol 3-quinasa; *p38MAPK*: proteína quinasa activada por mitógeno p38; *Erk*: quinasa regulada extracelular; *HSP27*: proteína de shock térmico; *CaM*: calmodulina; *CE*: célula endotelial (Valdes *et al.*, 2008).

ESTRÉS OXIDATIVO

El oxígeno debido a su reactividad, participa en la transferencia de electrones de alta energía, y por lo tanto a través de la fosforilación oxidativa posibilita la producción de grandes cantidades de adenosina-5-trifosfato (ATP), aunque también genera especies reactivas del oxígeno (ERO). Estas últimas pueden atacar a cualquier molécula biológica, ya sea proteína, lípido o ADN y modificar su estructura y función. Para neutralizar el efecto oxidativo de los ERO, las células han desarrollado un complejo sistema de defensas antioxidantes, que generalmente mantiene el equilibrio de oxidantes versus antioxidantes, sin embargo este equilibrio puede ser perturbado, provocando estrés oxidativo celular. Debido a los múltiples y diversos efectos del oxígeno en una célula, el estrés oxidativo se define mejor en términos generales como una alteración entre el equilibrio pro-oxidante-antioxidante en favor de los primeros que conduce a un daño potencial (Burton *et al.*, 2011).

Existe una cantidad considerable de evidencia que implica al estrés oxidativo en la fisiopatología de numerosas complicaciones durante la gestación. Si bien la formación de ERO puede ser normal y necesaria durante la preñez normal, un exceso de estos está relacionado con la patogenia de la pre-eclampsia e hipertensión durante la gestación (Sheppard *et al.*, 2010). Si la invasión trofoblástica es insuficiente y la remodelación vascular de las arterias espirales uterinas en el primer trimestre es defectuosa, puede ocurrir que se incremente la velocidad del flujo sanguíneo, dañando la arquitectura de las vellosidades y aumentando el riesgo de vasoconstricción y lesión por isquemia-reperusión espontánea generando estrés oxidativo (Pringle *et al.*, 2010). Un estrés oxidativo excesivo podría proporcionar una conexión entre la reducción de la presión-perfusión uterina y la disfunción generalizada de las células endoteliales observada en la pre-eclampsia. La hipoxia estimula la producción de anión superóxido y de peróxido de hidrógeno, ambos ERO, en las células endoteliales y el músculo liso vascular. Los radicales libre y los peróxidos lipídicos placentarios aumentan durante la pre-eclampsia (Sheppard *et al.*, 2010).

El ataque por las ERO puede ser inhibido por las defensas antioxidantes tanto de naturaleza enzimática como no enzimática. Las enzimas antioxidantes poseen un metal de transición en su núcleo, capaz de cambiar su número de oxidación al transferir electrones durante el proceso de desintoxicación. Entre estos catalizadores se destaca la superóxido dismutasa (SOD) que convierte al anión en peróxido de hidrógeno. Existen dos isoformas de esta enzima una que posee manganeso y cuya ubicación se limita a la mitocondria, y otra que posee cobre y zinc y se encuentra en el citosol. El peróxido de hidrógeno se descompone en agua por la acción de las enzima catalasa y glutatión peroxidasa (Figura 6). Las defensas no enzimáticas incluyen al ácido ascórbico (vitamina C) y al α -tocoferol (vitamina E). Éstos a su vez actúan en conjunto, ya que el ácido ascórbico es necesario para regenerar α -tocoferol reducido. Además, los compuestos tioles, como la tiorredoxina, son capaces de desintoxicar el peróxido de hidrógeno, pero a su vez requieren la conversión de nuevo a la forma reducida por tiorredoxina reductasa. La ceruloplasmina y la transferrina también juegan un papel importante al inhibir la reacción de Fenton, cataliza el peróxido de hidrógeno con metales de transición generando radicales altamente reactivos del oxhidrilo (OH), secuestrando los metales necesarios para que se produzca esta reacción y reduciendo la producción de OH (Burton *et al.*, 2011).

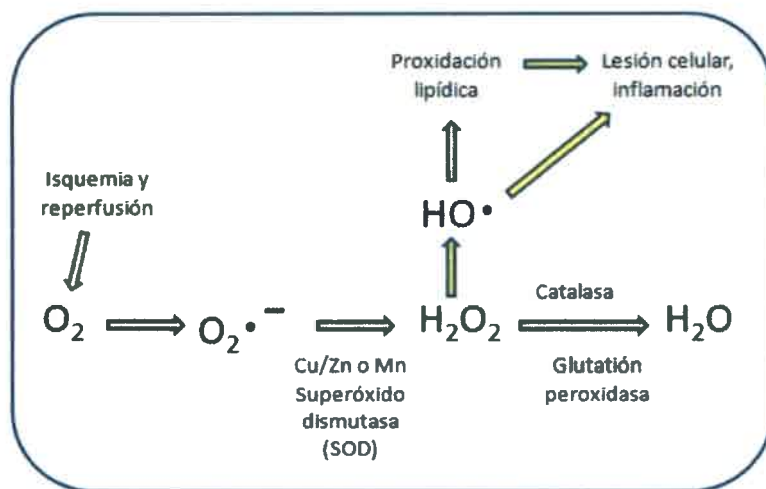


Figura 6: Proceso oxidativo producido por un fenómeno de isquemia-reperfusión y la acción de las enzimas antioxidantes. La ausencia o la insuficiencia de este mecanismo antioxidante conducen a un aumento de los ERO produciendo un aumento de la peroxidación lipídica y del daño celular (Oliveira *et al.* 2010).

PRE-ECLAMPSIA

La gestación normal está asociada con un aumento del ritmo cardíaco, del volumen plasmático y el gasto cardíaco, así como con una disminución de la resistencia vascular y de la presión arterial, esta última evidenciable durante la gestación tardía. Estos cambios hemodinámicos son beneficiosos para mantener el suministro necesario de sangre y de nutrientes al feto en crecimiento, y son en su mayor parte consecuencia del aumento en la cantidad y actividad de los vasodilatadores derivados del endotelio como el óxido nítrico (Sheppard *et al.*, 2010).

Los trastornos hipertensivos durante el embarazo son muy frecuentes y ocurren en más del 10 % de todas las gestaciones humanas que llegan a término. Estos trastornos hipertensivos constituyen la primera causa de muerte materna en los países desarrollados y la tercera en los países en vía de desarrollo, lo que representa 4 defunciones por cada 100.000 nacimientos y 150 defunciones o más por cada 100.000 nacimientos, respectivamente (Suárez González *et al.*, 2011).

La pre-eclampsia es un trastorno específico de la gestación que se presenta aproximadamente en 1 de cada 12 embarazos en los Estados Unidos, y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y fetal (Ahmed *et al.*, 2010). Se define como un síndrome multisistémico, caracterizado por la aparición súbita de hipertensión y proteinuria después de la semana 20 de gestación en mujeres normotensas y sin proteinuria previa. Es un trastorno que se produce en dos etapas, la primera es una mala adaptación del lecho vascular placentario debido a una falla en la remodelación completa de los canales de gran diámetro de las arterias espirales, observándose una reducción del flujo sanguíneo placentario. La segunda etapa es aquella en que la reducción de la perfusión sanguínea induce un estado de hipoxia, produciendo la liberación de una variedad de sustancias, incluidos desechos trofoblásticos, tejido necrótico y el exceso de secreción de factores antiangiogénicos (Ramesar *et al.*, 2010) (Figura 7).

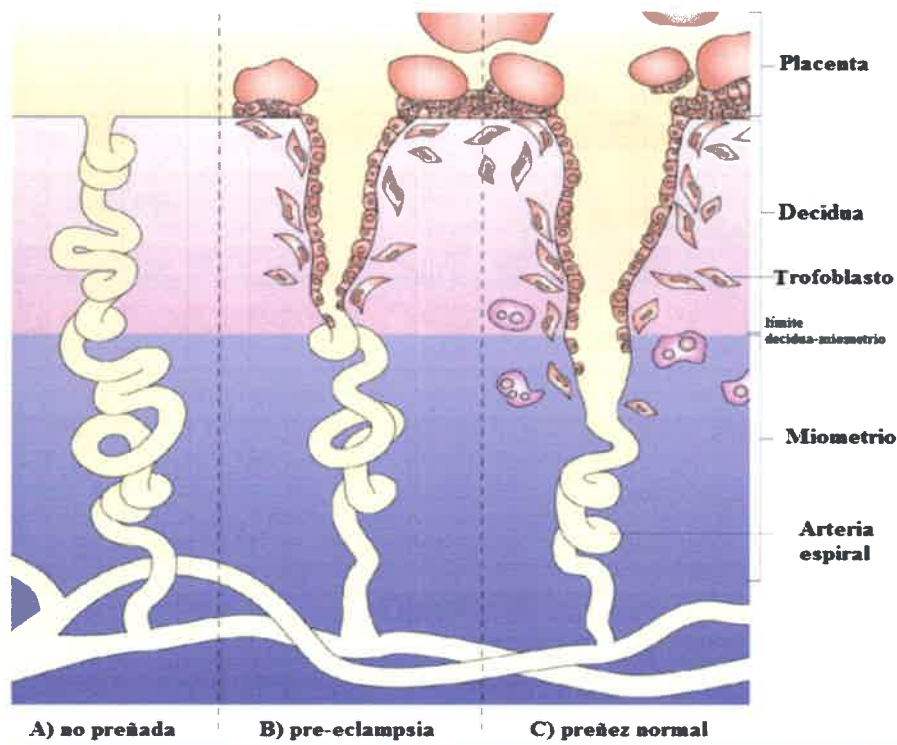


Figura 7: Invasión del trofoblasto y remodelación de la arteria espiral (Bell, 2004). A) no preñada, B) pre-eclampsia y C) preñez normal.

Durante la pre-eclampsia, la expresión anormal de las moléculas de adhesión celular y la apoptosis del citotrofoblasto conducen a una invasión de las arterias uterinas en espiral, tan solo en las capas superficiales de la decidua. La remodelación vascular de las arterias uterinas espirales es insuficiente y no cumple con las demandas del flujo de sangre fetal, ni con las demandas nutricionales del feto (Sheppard *et al.*, 2010). Las vellosidades terminales están pobremente diferenciadas y las distales se truncan. Estos cambios patológicos son acompañados a menudo por una restricción del crecimiento intrauterino (IUGR del inglés “intrauterine growth restriction”) (Furuya *et al.*, 2011). A su vez, la disminución del flujo sanguíneo en el útero a menudo se correlaciona con el aumento de la mortalidad fetal y la morbilidad y mortalidad neonatal (Reynolds *et al.*, 2006).

En pacientes con pre-eclampsia se detectan en la sangre niveles excesivos de varias moléculas antiangiogénicas, como por ejemplo la forma soluble del receptor 1 del factor

de crecimiento endotelial (sVEGFR1 o también sFlt1), el cual suprime las señales mediadas por VEGF y el factor de crecimiento placentario (PIGF). Los mecanismos que incrementan la resistencia vascular y la hipertensión pueden ser explicados en parte por la insuficiente producción de NO. Este es un potente vasodilatador, los inhibidores de la angiogénesis como el sFlt1, suprimen la expresión de eNOS, lo cual reduce la producción de NO e incrementa la resistencia vascular (Furuya *et al.*, 2011) (Figura 5).

En la pre-eclampsia los elevados niveles séricos de VEGF pueden estar implicados en la activación o disfunción de las células endoteliales. El VEGF aumenta en el plasma materno antes de la aparición clínica de la pre-eclampsia y es más elevado durante la fase de vasoconstricción de la enfermedad. Es posible que la circulación hiperdinámica en la fase latente de la pre-eclampsia pueda inducir estrés de cizallamiento vascular, lo que aumentaría el VEGF circulante. Debido a que el VEGF actúa normalmente como un vasodilatador, mediante la estimulación de la GMPc, su aumento puede representar una respuesta vascular insatisfactoria durante la pre-eclampsia. El incremento de VEGF, promueve la unión de la calmodulina a la eNOS, aumentando su actividad y estimulando la producción de NO (Sheppard *et al.*, 2010).

Hasta la fecha no se conoce ningún tratamiento específico para la pre-eclampsia. Los agentes antihipertensivos, comúnmente utilizados, causan vasodilatación sistémica y puede mejorar ligeramente el control de la presión arterial, pero no tienen efectos clínicos significativos en la mejora de la función renal y en el aumento del flujo sanguíneo en la placenta. En última instancia, es la disminución del flujo sanguíneo en la placenta, la que conduce a un retraso del crecimiento intrauterino y la disfunción endotelial (Ramesar *et al.*, 2012).

Existen varios modelos que permiten evaluar las estrategias terapéuticas para el tratamiento de la pre-eclampsia. Uno de estos modelos se logra con el empleo de inhibidores de la NOS, como por ejemplo L-NAME, que reducen la formación de NO, incrementando la resistencia vascular placentaria y reduciendo el flujo sanguíneo placentario, ocasionando un cuadro de pre-eclampsia similar al observado en el ser humano.

L-NITROARGININA METIL ÉSTER (L-NAME)

El tratamiento con L-NAME, un inhibidor de la NOS, reduce la formación de NO y genera cambios patológicos similares a los observados en mujeres con pre-eclampsia, tales como vasoconstricción renal grave, proteinuria y trombocitopenia (Cauli *et al.*, 2010). El L-NAME no inhibe la vasodilatación inducida por el citrato de sildenafil, indicando que no se requiere la generación *de novo* de NO para producir vasorrelajación mediada por el citrato de sildenafil en circulación (Maharaj *et al.*, 2009). Los primeros cambios patológicos semejantes a los de la pre-eclampsia en ratones hembras tratadas con L-NAME podrían estar dados por la formación de trombos en la placenta, que causa la disfunción placentaria observándose una mayor tasa de reabsorción fetal, IUGR y la muerte fetal posterior. Estos síntomas ocurren en las primeras etapas de la preñez y están asociados con el desarrollo anormal de la placenta y con lesiones como necrosis fibrinoide y edema intersticial. Estas lesiones podrían aumentar la resistencia vascular placentaria y reducir el flujo sanguíneo placentario y, en consecuencia, el suministro de oxígeno al feto, lo que en última instancia resulta en la IUGR (Ma *et al.*, 2010). Durante la gestación normal aumenta la formación de peróxidos de lípidos, y estos se incrementan aún más en gestaciones de mujeres con pre-eclampsia. Estos peróxidos de lípidos se producen principalmente en la placenta debido a la disrupción de la membrana celular generada por la acción de ERO (Borrego-Díaz *et al.*, 2008). También se encontró un aumento estadísticamente significativo de la concentración de malondialdehído (MDA) en placenta de ratas tratadas con L-NAME al final de la gestación (Yang *et al.*, 2011).

SILDENAFIL

El sildenafil es un inhibidor específico de la 5-PDE, que aumenta los efectos vasodilatadores del NO sobre el músculo liso vascular ya que previene la degradación del GMPc (Sher *et al.*, 2002; Yildirim *et al.*, 2010). El sildenafil llevó a una recuperación del flujo sanguíneo, un incremento en la neovascularización y una reducción del estrés oxidativo en músculos isquémicos de ratones con hipercolesterolemia ApoE(-/-). Los mecanismos moleculares involucrados incluyen efectos beneficiosos sobre vías de transducción de la angiogénesis, junto con un aumento en el número y la actividad de las células progenitoras endoteliales (Dussault *et al.*, 2009). En mujeres, la administración intravaginal de sildenafil, aumentó el desarrollo endometrial en un 70 % de las pacientes con endometrio delgado sometidas a fertilización *in vitro*, aumentando las tasas de implantación y de embarazo (Sher *et al.*, 2002). Además el uso de tabletas de sildenafil intravaginales tuvo un efecto antiabortivo en pacientes con abortos espontáneos repetidos sin causa aparente (El-Far *et al.*, 2009). En un estudio realizado en ratas preñadas, se determinó que el uso de sildenafil no indujo cambios fetales y las gestaciones fueron normales (Sasser *et al.*, 2010). Por otro lado, este compuesto causó la relajación miométrial de manera dosis-dependiente en mujeres embarazadas, mediante un mecanismo independiente del GMPc y posiblemente dependiente de los canales de potasio (Khan *et al.*, 2004). En arterias de pequeño calibre de placenta humana se reportó que el citrato de sildenafil puede mejorar la perfusión del miometrio en los embarazos con IUGR, promoviendo la vasodilatación de las arterias pequeñas del miometrio, disminuyendo la resistencia periférica y aumentando el flujo dentro del lecho útero-placentario (Wareing *et al.*, 2006).

También el uso de sildenafil inhibe la peroxidación lipídica del tejido lesionado, junto con la reposición del contenido de glutatión, esto implicaría que el compuesto es beneficioso para mantener el equilibrio oxidante-antioxidante (Yildirim *et al.*, 2010).

La disfuncionalidad de la vía de señalización del NO, produce una inadecuada perfusión uterina, como se observa en embarazos con pre-eclampsia o con IUGR complicada. Actualmente la investigación sobre pre-eclampsia en seres humanos y animales está

centrada en las terapias que manipulan la vía de NO, incluyendo los donadores de NO y el sildenafil (Hale *et al.*, 2010).

Por lo antes mencionado se propone que en un modelo murino de pre-eclampsia el uso de sildenafil mantendría las concentraciones de NO elevadas. Este fármaco favorecería los efectos vasodilatadores y estimuladores de la angiogénesis mediados por NO y, en consecuencia, se lograría mejorar la eficiencia placentaria.



“Un deseo presupone la posibilidad de la acción necesaria para su logro, Una acción presupone un objetivo digno de ser alcanzado”.

Ayn Rand

HIPÓTESIS

Y

OBJETIVOS

HIPOTESIS

El uso estratégico de sildenafil mejora el desarrollo vascular y disminuye el estrés oxidativo de la interfase materno–fetal en ratones hembras preñadas con síndrome de pre-eclampsia.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos del tratamiento con sildenafil sobre la vascularización y el estrés oxidativo de la interfase materno fetal en un modelo murino con pre-eclampsia.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- I. Establecer un protocolo de inducción de pre-eclampsia y administración de sildenafil en ratones hembras preñadas.
- II. Realizar un estudio morfométrico placentario y fetal en ratones hembra con pre-eclampsia y tratadas con sildenafil.
- III. Realizar mediciones de la vascularización de la interfase materno-fetal de ratones hembras con pre-eclampsia y tratadas con sildenafil.
- IV. Determinar el estrés oxidativo en la interfase materno–fetal de ratones hembras con pre-eclampsia y tratadas con sildenafil.

“Quédate ante la puerta si quieres que te la abran. No dejes el camino si quieres que te guíen. Nada está nunca cerrado sino a tus propios ojos”.

Farid al-din Attar

MATERIALES

Y

MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se seleccionaron 20 hembras preñadas de ratón de la cepa Balb/c, vírgenes de 80 a 120 días de edad, las cuales fueron apareadas con machos adultos. El día de aparición del tapón mucoso vaginal (post-coital) fue considerado como el día 0 de preñez. Los animales fueron mantenidos a temperatura estándar de bioterio (22° C), iluminación controlada (14 h-luz, 10-h oscuridad) y acceso *ad libitum* al alimento balanceado (“Ratón-Ratas” GEPSA FEEDS) y al agua (Figura 8). Todos los procedimientos que involucraron animales se llevaron a cabo de acuerdo con los fundamentos del trabajo con animales de laboratorio en proyectos de investigación (Perez, 2007) y la Guía para la Eutanasia de la AVMA (AVMA, 2007). Este trabajo fue aprobado por el comité de ética de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

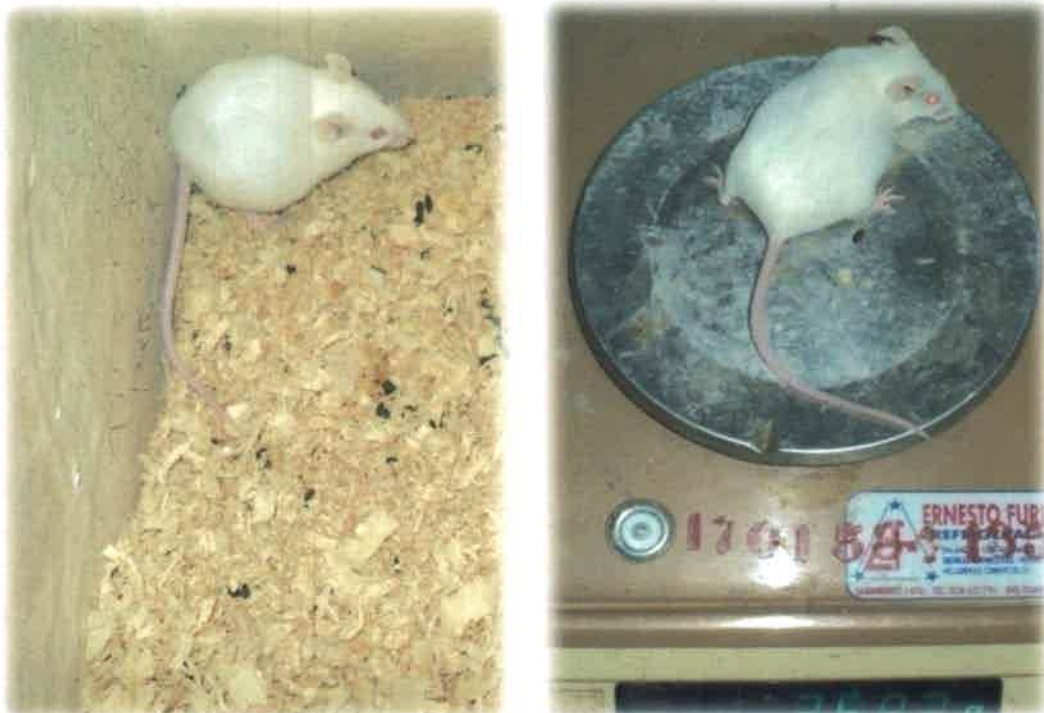


Figura 8: Alojamiento y determinación del peso.

MODELO EXPERIMENTAL

Para evaluar el efecto de la administración de citrato de sildenafil sobre la placenta, se utilizó un modelo murino de preñez con pre-eclampsia inducida con L-NAME.

1) Para inducir la pre-eclampsia en los ratones, durante 10 días se administraron 50 mg/kg de L-NAME diluido en solución fisiológica por vía subcutánea (Ma *et al.*, 2010).

2) Para evaluar el efecto del tratamiento con sildenafil, se administraron durante 9 días, vía oral mediante una cánula, 10 mg/kg de citrato de sildenafil disuelto en agua destilada (Yildirim *et al.*, 2010).

GRUPOS EXPERIMENTALES

Los animales fueron divididos en 4 grupos experimentales, cada uno con 5 individuos:

Grupo vehículo: a partir del día 7 de preñez se administraron 0,04 ml de solución fisiológica por vía subcutánea y a partir del día 8 de preñez se suministró agua destilada (0,04 ml) en forma oral mediante una cánula.

Grupo sildenafil: a partir del día 7 de gestación se administró solución fisiológica (0,04 ml) por vía subcutánea y a partir del día 8 de preñez se administró citrato de sildenafil (10 mg/kg) vía oral mediante una cánula.

Grupo L-NAME: a partir del día 7 de gestación se administró L-NAME (50 mg/kg) diluido en solución fisiológica por vía subcutánea y a partir del día 8 de preñez se suministró agua destilada (0,04 ml) en forma oral mediante una cánula.

Grupo L-NAME + sildenafil: a partir del día 7 de gestación se administró L-NAME (50 mg/kg) diluido en solución fisiológica por vía subcutánea y a partir del día 8 de preñez se administró citrato de sildenafil (10 mg/kg) vía oral mediante una cánula.

Todos los procedimientos se repitieron diariamente hasta el día 16 de preñez inclusive, respetando el mismo horario en todo el ensayo (Figura 9).

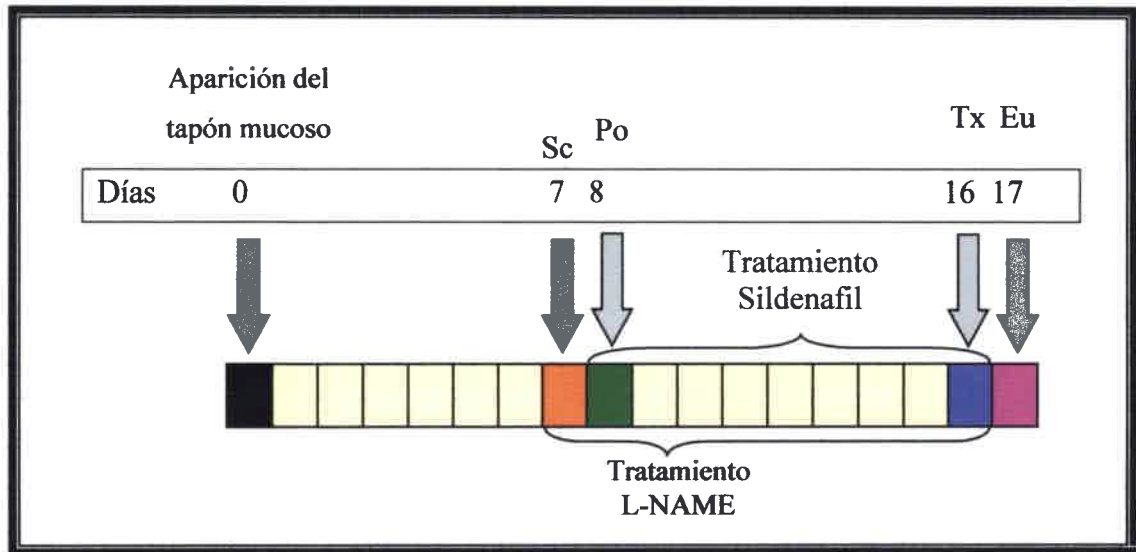


Figura 9: Esquemmatización del modelo experimental.

Sc: tratamiento subcutáneo con L-NAME.

Po: tratamiento oral con sildenafil.

Tx: último tratamiento administrado.

Eu: día de eutanasia.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS

Para obtención de las muestras se efectuó la eutanasia de los animales en la mañana del día 17 de gestación mediante la técnica de dislocación cervical (AVMA, 2007). Inmediatamente se registraron los datos de masa corporal materna.

Se realizó la apertura del abdomen con una incisión por la línea media para colectar las muestras de las unidades feto-placentarias (Figura 10A). Se extrajo el tracto reproductivo completo (ovarios, oviducto, cuernos, cuerpo y cuello uterino), se lavó con solución salina fisiológica estéril, se depositó en una placa de Petri estéril y se procedió a contar el número de vesículas por cuerno uterino (Figura 10B).

Por último, se diseccionaron los cuernos uterinos (con una incisión realizada a través del ligamento intercornal), el cuerpo y el cuello uterino. El cuerno izquierdo fue inmediatamente fijado en formol al 10 % con una la relación de volumen fijador-tejido 10:1, para su posterior análisis histológico. El cuerno uterino derecho se empleó para el

análisis morfométrico y la preparación de homogenatos placentarios y fetales, que luego fueron utilizados para evaluar el estrés oxidativo.

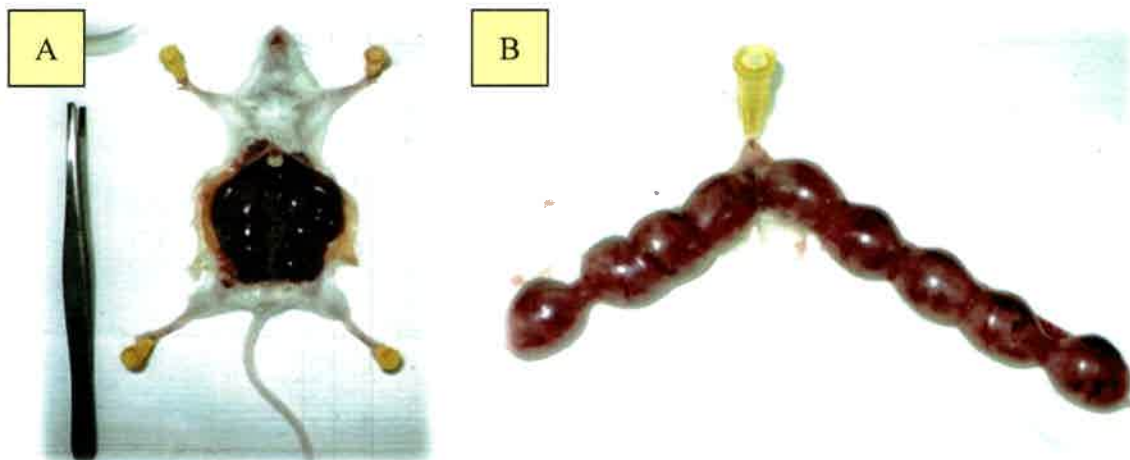


Figura 10: Necropsia y observación macroscópica del útero. A) laparotomía media. B) cuerno uterino.

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Para realizar el análisis morfométrico se diseccionó cada una de las vesículas embrionarias del cuerno uterino derecho. En una placa de petri se colectó en forma individual cada placenta y su correspondiente feto, retirando cuidadosamente las membranas extraembrionarias (Figura 11).



Figura 11: A) Porción uterina que contiene una vesícula embrionaria envuelta en las membranas fetales. B) Feto (F) y placenta (P) separados de las membranas embrionarias.

Luego cada feto y placenta se pesaron en una balanza analítica (Sartorius BP 1215, USA) y finalmente con un calibre manual se tomaron las distintas medidas para realizar el análisis morfométrico de la placenta y del feto (Figura 12).

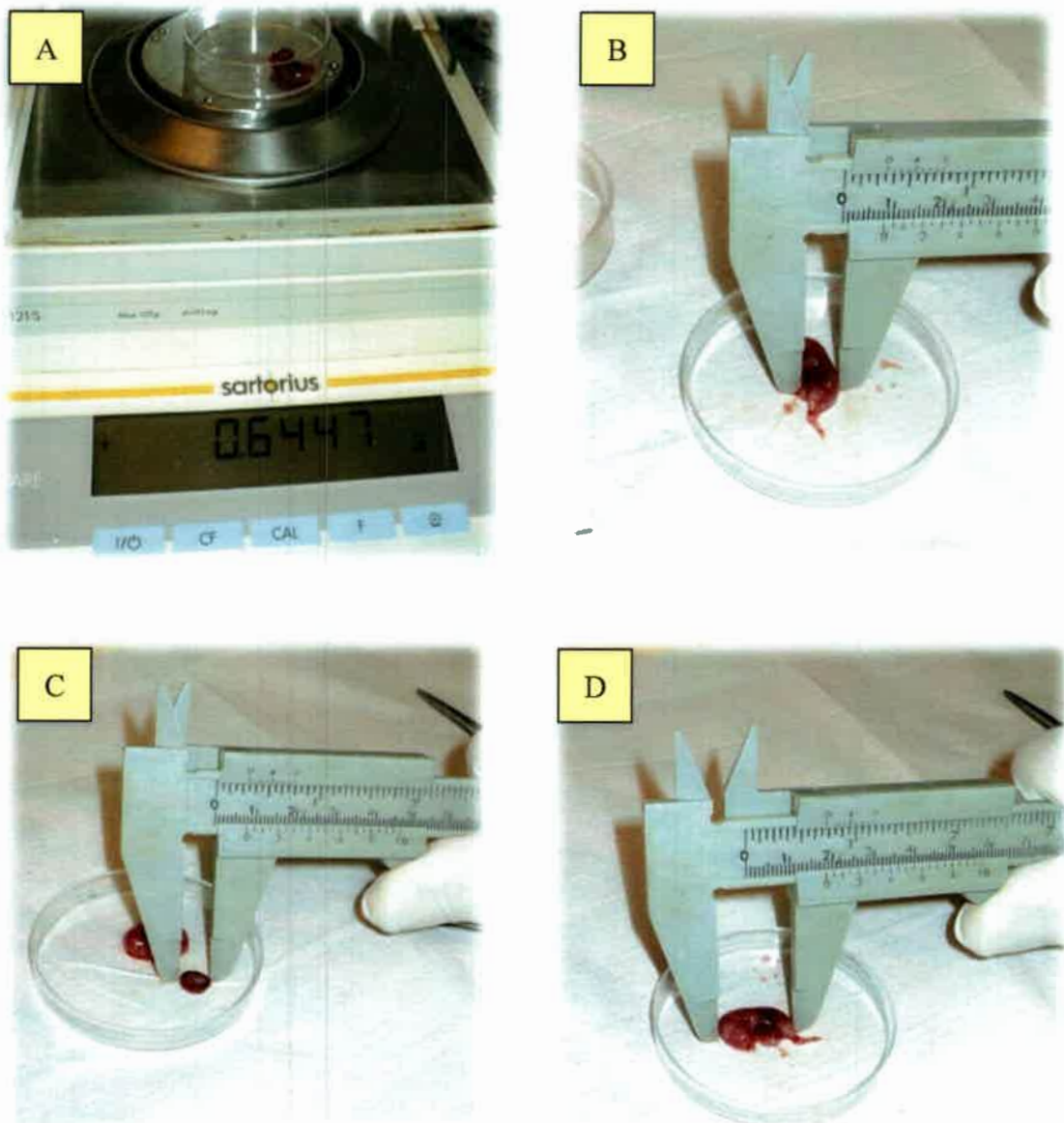


Figura 12: Análisis morfométrico de los fetos y placenta. A) Pesado de feto. B) Medición de la longitud dorso-ventral. C) Medición del diámetro mayor de la placenta. D) Medición de la longitud cráneo rabadilla.

Las variables registradas para realizar el análisis morfométrico se detallan a continuación:

De cada uno de los animales se determinaron:

- Número de embriones totales.
- Número de embriones implantados en los cuernos derecho e izquierdo.

De cada uno de los fetos del cuerno derecho se establecieron:

- Peso (en mg).
- Longitud cráneo rabadilla.
- Diámetro bilateral (derecha-izquierda).
- Longitud dorso-ventral.

De cada una de las placentas del cuerno derecho se midieron:

- Peso (en mg).
- Diámetro mayor.
- Diámetro menor.
- Altura.

Con los datos obtenidos, se calcularon para los distintos grupos de estudio los siguientes valores promedios:

Número de embriones, Peso fetal y Peso placentario

- Número promedio de embriones.
- Peso fetal promedio para cada animal.
- Peso placentario promedio para cada animal.

Observaciones: El número promedio de embriones por grupo se obtuvo calculando la media del número de vesículas embrionarias observadas en los dos cuernos uterinos. Para calcular el peso promedio fetal y el peso promedio placentario solamente se utilizaron las vesículas del cuerno uterino derecho.

Longitudes y diámetros fetales

- Longitud cráneo rabadilla fetal promedio para cada animal.
- Diámetro bilateral promedio de cada feto.
- Longitud dorso-ventral promedio de cada feto.

Diámetros y altura placentaria

- Diámetro mayor placentario promedio para cada animal (Figura 13, A).
- Diámetro menor placentario promedio para cada animal (Figura 13, B).
- Altura placentaria promedio para cada animal.

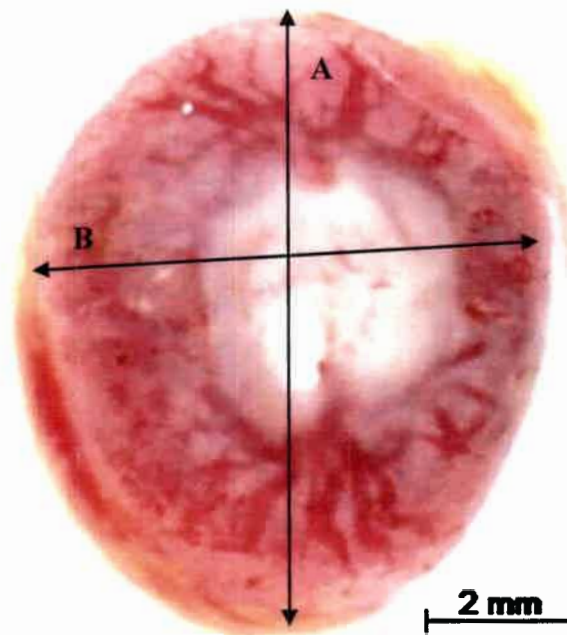


Figura 13: Foto de placenta murina de 17 días de gestación sin membranas fetales. A) diámetro mayor. B) diámetro menor.

Eficiencia placentaria

- Eficiencia placentaria promedio para cada animal, se calculó como el cociente entre el promedio de peso fetal y el promedio de peso placentario.

Observación: Primero se calculó la eficiencia placentaria para cada animal y luego se calculó la eficiencia placentaria para cada grupo en estudio.

El cálculo de los valores promedios por grupo de cada una de las variables obtenidas durante la recolección de datos se realizó con la siguiente fórmula:

$$X = \frac{\sum \left(\frac{\sum (a_1, b_1, c_1, \dots, x_1)}{n_1} \right); \left(\frac{\sum (a_2, b_2, c_2, \dots, x_2)}{n_2} \right); \left(\frac{\sum (a_3, b_3, c_3, \dots, x_3)}{n_3} \right); \dots}{N}$$

Donde:

X= promedio de la variable en estudio por grupo.

(a, b, c, ..., x) = las letras indican la variable en estudio de cada feto medido en cada hembra.

n= número de embriones por cada animal.

N= número de animales por grupo.

Por ejemplo para calcular el peso promedio fetal por grupo se promediaron todos los pesos fetales pertenecientes al mismo animal y luego se calculo una media con los pesos promedios fetales de cada animal obteniéndose el peso promedio por grupo.

TÉCNICAS IMPLEMENTADAS

HOMOGENATOS PLACENTARIOS Y FETALES

Las placentas y los fetos diseccionados de las 2 vesículas embrionarias centrales del cuerno uterino derecho fueron colocados individualmente en tubos plásticos de 10 ml y se le agregaron 3 ml de *buffer* para estrés oxidativo (ver Anexo I).

Luego se procedió a homogenizar en forma manual con un vástago de teflón, realizando 20 movimientos para cada placenta y 40 movimientos para cada feto. Todo el proceso de homogenización se realizó colocando y manteniendo los tubos en un recipiente con hielo en escamas.

Posteriormente, se procedió a centrifugar los tubos en frío (2 °C) en una centrífuga refrigerada (Biofuge stratos Heraeus, Alemania). El sobrenadante resultante fue fraccionado en tubos Eppendorf y guardado a -80 °C para la posterior determinación de la concentración de proteínas, de la formación de peróxidos lipídicos y de la actividad de la enzima antioxidante Catalasa (Figura 14).

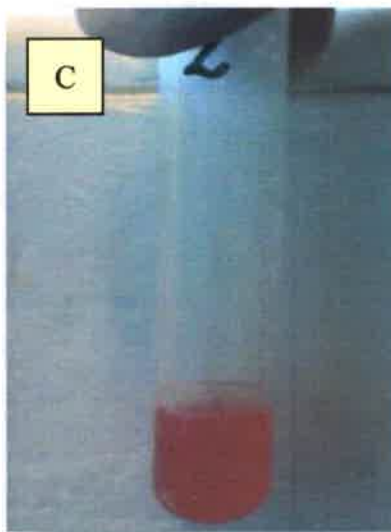
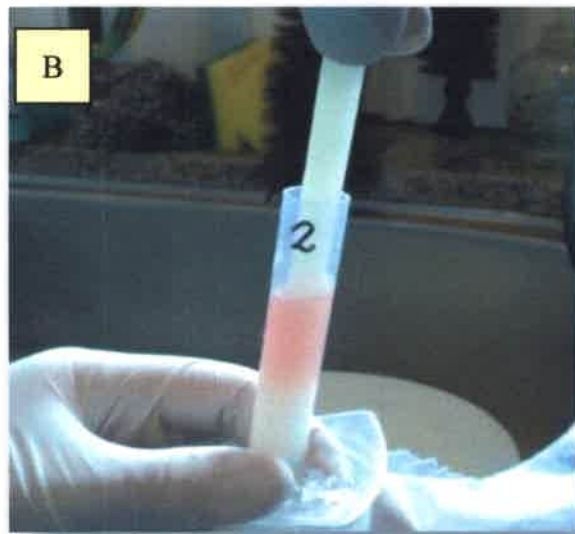


Figura 14: Proceso para lograr los homogenatos de las muestras. A) inclusión del tejido en el homogeneizador manual. B) homogenizado del tejido. C) homogenato resultante D) centrifuga Biofuge stratos Heraeus, Alemania.

CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES

Para referir las concentraciones de nanomoles de MDA y milimoles de Catalasa de los homogenatos por miligramo de proteína se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford. (Bradford, 1976).

Este método permite determinar la concentración de proteínas solubles en una muestra. El fundamento de esta técnica se basa en que el colorante de Coomassie se une principalmente a los residuos aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas, especialmente arginina. Cuando ocurre esta unión, su absorbancia máxima cambia de 465 nm a 595 nm.

Para determinar la concentración de proteína se realizó una curva patrón con diferentes diluciones de albúmina sérica bovina, 50 µl de hidróxido de sodio 1 N y 1 ml de reactivo Azul Brillante de Coomassie G250.

Para la determinación de proteínas en las muestras se colocaron 50 µl de las mismas y 50 µl de hidróxido de sodio 1 N, por último se colocó 1 ml de reactivo azul brillante de Coomassie G250. Las absorbancias se determinaron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm. La metodología se describe detalladamente en el Anexo II.

Ejemplo de curva patrón

Tabla 1: Ejemplo de una curva patrón obtenido por el método de Bradford.

Tubo	masa Alb µg	Absorbancia	Absorbancia-Blanco
Blanco	0,0	0,669	0,000
1	2,5	0,821	0,152
2	5,0	0,987	0,318
3	7,5	1,178	0,509
4	10,0	1,294	0,625
5	12,5	1,466	0,797
6	15,0	1,564	0,895

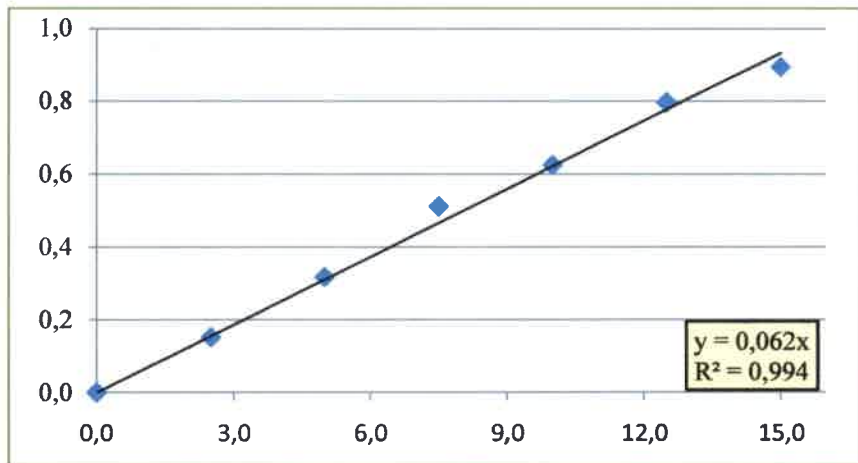


Figura 15: Curva patrón de los resultados ejemplificados en la tabla 1.

Con los valores obtenidos se construyó una curva patrón y se obtuvo una ecuación de la recta correspondiente, con la cual se calcularon las concentraciones de proteínas de las muestras analizadas.

La ecuación utilizada fue la siguiente:

$$x = (ab / y) * d$$

Donde:

x= concentración de proteína (mg/ml).

ab= resulta de la diferencia entre el valor de absorbancia obtenido y el valor de absorbancia del tubo blanco.

y= pendiente de la curva patrón.

d= factor de dilución de la muestra.

Ejemplo de cálculo

El cálculo de la concentración de proteínas en el homogenato de placenta de la muestra número 15, utilizando la curva patrón anteriormente mencionado se realizó del siguiente modo:

Valor de absorbancia obtenido de la muestra= 1,162

$$ab = 1,162 - 0,669 = 0,493$$

$$y = 0,0623$$

$$d = 20$$

$$x = (ab / y) * d = (0,493/0,0623)*20 = 158,27 \text{ mg/ml}$$

ESTRÉS OXIDATIVO

Para valorar el estrés oxidativo se utilizaron homogenatos de placentas y fetos conservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para tal fin. Se determinó el daño oxidativo a lípidos por la técnica que cuantifica las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y la actividad de la enzima antioxidante catalasa. Las determinaciones se efectuaron en las placentas de las 2 vesículas embrionarias centrales del cuerno uterino derecho.

Daño oxidativo a lípidos

Se utilizó la técnica de TBARS propuesta por Buege *et al.*, 1978 con modificaciones. Esta técnica mide la cantidad de malondialdehído (MDA) formado por la ruptura de ácidos grasos poliinsaturados que ocurre durante la oxidación de los lípidos y pueden ser considerados como un indicador de la peroxidación lipídica. Un mol MDA reacciona con 2 moles de ácido 2-tiobarbitúrico 0.375 % (TBA) en medio ácido y a alta temperatura, formando aductos cromógenos de MDA-TBA muy estables de color rojo (Figura 16). Esta reacción se puede cuantificar por espectrofotometría de absorción visible y su pico de absorbancia se encuentra entre los 532-535 nm.

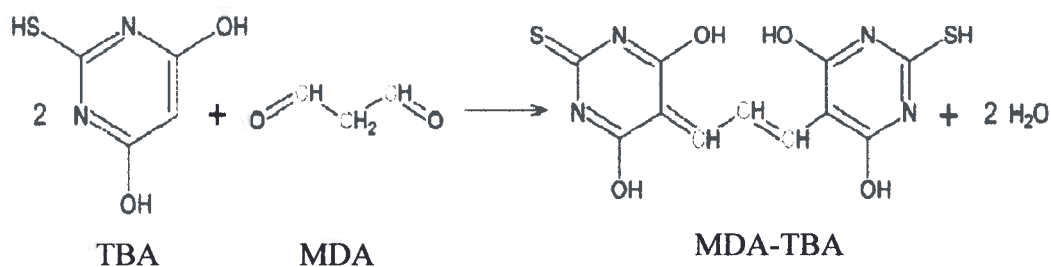


Figura 16: Esquema de la reacción entre MDA y TBA.

Para determinar la concentración de MDA se realizó una curva patrón con diferentes diluciones de una solución estándar de Tetrametozipropano (TMP). La preparación de la solución estándar se realizó a partir de un hidrolizado de TMP con ácido clorhídrico (HCl) 1 M que luego fue disuelto en agua destilada, obteniéndose una solución con 23 428 nmoles de MDA. Con la solución estándar se preparó 1 ml de cada uno de las siguientes concentraciones: 183, 366, 732, 1 463, 2 967 y 5 854 nmoles de MDA, las que se utilizaron para trazar una curva patrón con 6 puntos de concentraciones diferentes de MDA.

Se emplearon tubos de polipropileno con tapa a rosca para realizar las determinaciones, colocando en cada uno de ellos 600 μ l de ácido tricloroacético 15 % (TCA), 600 μ l de TBA 0,375 %, 20 μ l de la correspondiente dilución de la solución patrón de los distintos puntos de la curva estándar, previamente preparada y 580 μ l agua destilada. Las muestras problema se analizaron por triplicado y en los tubos que contenían 600 μ l de estas muestras se agregaron 600 μ l de TCA 15 % y 600 μ l de TBA 0,375 %.

Los tubos fueron calentados a baño María a 90 °C por 30 minutos. Luego para detener la reacción se enfriaron en freezer a -20 °C durante 10 minutos, se les colocó 1,8 ml de alcohol isobutílico y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos a 2 °C. Finalmente se midió la absorbancia a 535 nm (ver Anexo III). La peroxidación lipídica fue expresada como nmol de MDA/mg proteína.

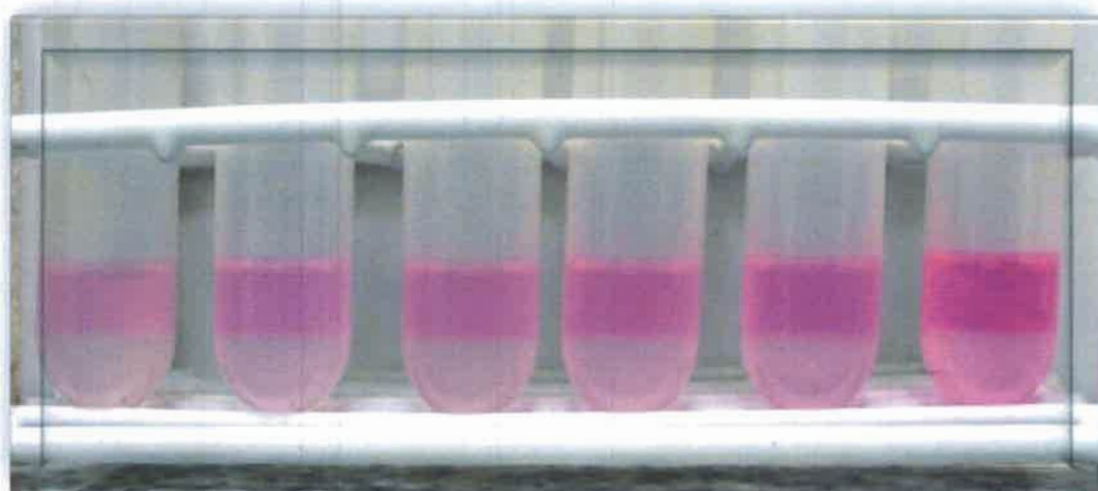


Figura 17: Curva estándar utilizada como patrón para calcular la cantidad de MDA en las muestras.

Ejemplo de curva patrón

Tabla 2: Ejemplo de curva patrón de TBARS.

	nm de MDA	Absorbancia	Absorbancia-Blanco
Blanco	0	0,125	0
1	183	0,253	0,128
2	366	0,352	0,227
3	732	0,542	0,417
4	1 463	0,928	0,803
5	2 967	1,754	1,629
6	5 854	3,143	3,018

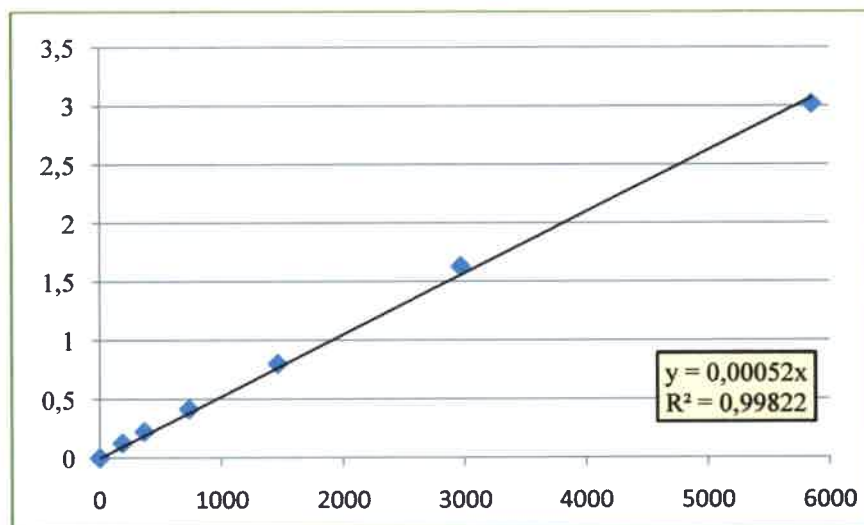


Figura 18: Curva patrón de los resultados expuestos en la Tabla 2.

Con los valores obtenidos se construyó una curva patrón y se obtuvo una ecuación de la recta correspondiente, con la cual se calcularon las concentraciones de proteínas de las muestras analizadas.

La ecuación utilizada fue la siguiente:

$$x = [(ab / y) * d] / c$$

Donde:

x= nmoles de MDA por mg de proteína.

ab= resulta de la diferencia entre el valor de absorbancia obtenido de la muestra y el valor de absorbancia del tubo blanco.

y= pendiente de la curva patrón.

c= concentración de proteína determinada por Bradford (mg/ml).

d= factor de dilución de la muestra.

Ejemplo de cálculo

El cálculo de los nmoles de MDA del homogenato de placenta de la muestra número 15, utilizando la curva patrón anteriormente mencionada se realiza del siguiente modo:

Valor de absorbancia obtenido de la muestra= 0,288

$$ab = 0,288 - 0,125 = 0,163$$

$$y = 0,00052$$

$$c = 203 \text{ mg/ml}$$

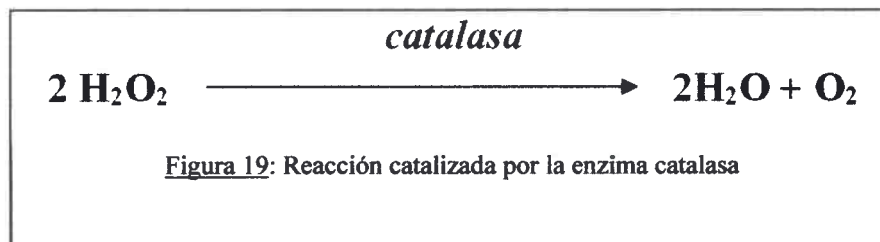
$$d = 100$$

$$x = [(ab / y) * d] / c = ((0,163 / 0,00052) * 100) / 203 =$$

$$154,41 \text{ nmol/mg}$$

Actividad de enzimas antioxidantes

Se cuantificó la actividad de la enzima antioxidante catalasa utilizando el método descrito por Chance (1954) con algunas modificaciones. Esta técnica se fundamenta en la capacidad de la enzima catalasa para catalizar la conversión de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno (Figura 19).



El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) absorbe a una longitud de onda de 240 nm, esta característica permite determinar por espectrofotometría la extinción molar de este y cuantificar la actividad de la enzima catalasa en muestras.

Para evaluar la actividad de la catalasa se colocaron en una cubeta de cuarzo para espectrofotometría 3 ml de buffer fosfato (pH=7,2), 100 μl de la muestra y 100 μl de peróxido de hidrógeno al 10 %. Las lecturas de las absorbancias se realizaron cada 10 segundos durante 2 minutos, a una longitud de onda de 240 nm. Se graficó la absorbancia en función del tiempo y se calculó la pendiente de la curva. Para obtener los valores de catalasa por gramo de proteína se efectuó el siguiente cálculo:

$$x = (k' * d) / (k * c)$$

Donde:

x= milimoles de catalasa por miligramos de proteína (mM/mg).

k'= pendiente del gráfico.

k= coeficiente de extinción molar de la catalasa ($4,6 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

d= factor de dilución de la muestra.

c= concentración de proteína determinada por Bradford (mg/ml).

Ejemplo de curva patrón

Tabla 3: Ejemplo de curva patrón de la actividad de la catalasa

Segundos	Absorbancia
0	0,90
10	0,89
20	0,89
30	0,88
40	0,87
50	0,87
60	0,86
70	0,86
80	0,85
90	0,85
100	0,84
110	0,84
120	0,83

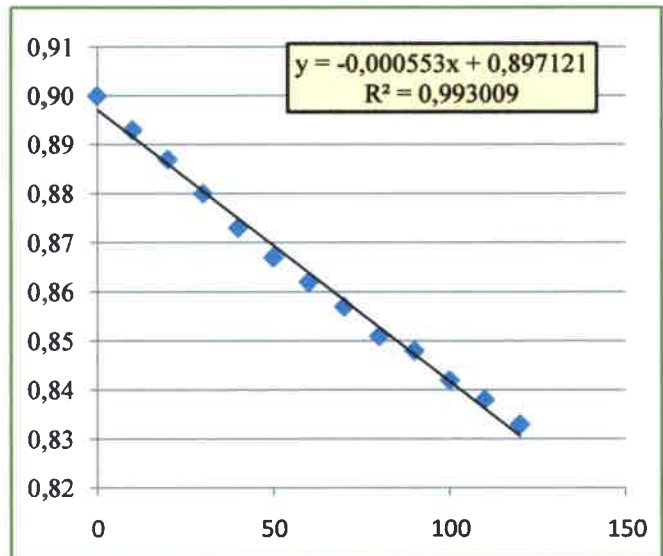


Figura 20: Curva patrón de los resultados expuestos en la Tabla 3.

Ejemplo de cálculo

El cálculo de los milimoles de catalasa presentes por miligramo de proteína en el homogenato de placenta de la muestra número 2, utilizando la curva de extinción molar de la catalasa anteriormente mencionada se realiza del siguiente modo:

$$k' = -0,000553.$$

$$k = 0,00000046 = 4,6 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

$$d = 10.$$

$$c = 94,90.$$

$$x = (k' * d) / (k * c) = (0,000553 * 10) / (0,00000046 * 94,90) =$$

$$146,60 \text{ mmol/mg}$$

HISTOLOGÍA / HISTOPATOLOGÍA

La vesícula central del cuerno uterino derecho, previamente fijada en formol al 10 % con solución salina tamponada con fosfato (PBS), fue sometida a la técnica histológica convencional para luego ser montada sobre un taco de madera. Posteriormente se cortó con micrótopo en delgadas láminas de 5-6 micrómetros que se colocaron en agua a 52 °C y se recogieron con portaobjetos atemperados. Las láminas se cortaron paralelas al diámetro mayor placentario y a la altura del centro del diámetro menor placentario. Finalmente se montaron con gelatina como adhesivo y se secaron sobre platina térmica. Se confeccionaron preparados para realizar tinciones con Hematoxilina/Eosina, para evaluar su morfología histológica y lectinhistoquímica, para valorar el endotelio fetal.

Coloración de Hematoxilina/Eosina

Para realizar la tinción convencional, las muestras montadas en portaobjetos se desparafinaron en xilol. Se rehidrató el tejido con pasajes sucesivos por alcohol en concentraciones decrecientes. Luego se colorearon las muestras con Hematoxilina/Eosina. Posteriormente se realizaron nuevos pasajes por alcoholes con graduación creciente para extraer el agua, y se aclararon las muestras con xilol. Se utilizó bálsamo de Canadá para realizar el montaje y finalmente se secaron los preparados en estufa a 60 °C.

Lectinhistoquímica

Previo a la realización de la técnica de lectinhistoquímica las muestras se desparafinaron en pasajes sucesivos en xilol y se rehidrataron los tejidos con pasajes sucesivos por alcohol en concentraciones decrecientes. Se procedió al bloqueo de las uniones inespecíficas usando peróxido de hidrógeno en metanol. Posteriormente, para incrementar la exposición de residuos de carbohidratos se efectuaron 2 pasajes por microondas durante 5 minutos a 750 w, en un buffer de citrato a pH 6. Si bien este

procedimiento no siempre se realiza para la lectinhistoquímica, en el caso específico de la lectina BS-I (extraída de las semillas de la planta *Griffonia simplicifolia*, con afinidad por los grupos terminales α -D-galactopyranosyl y utilizada para la determinación de endotelios murinos) se considera indispensable algún tratamiento similar a los que se usan para recuperar antígenos en inmunohistoquímica (Doherty *et al.*, 2003). Se realizó un lavaje con PBS y los cortes se incubaron 2 horas con la lectina BS-I biotinilada a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados con PBS y por último las muestras se trataron con el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) con peróxido de hidrogeno. Como tinción de contraste se utilizó Hematoxilina.

OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

Para el análisis de imágenes de histología y lectinhistoquímica se obtuvieron fotografías con una cámara canon G5, montada en un microscopio óptico Carl Zeiss Axiostar Plus, Alemania.

Se fotografiaron las placentas en un aumento de 40x para realizar un fotomontaje con el programa ZoomBrowser Ex 5.0. (Figura 21).

De los preparados sometidos a lectinhistoquímica se capturaron 5 imágenes por corte histológico con un aumento de 400x (Figura 22), estas imágenes fueron utilizadas para evaluar el porcentaje de endotelio fetal marcado con lectina BS-I.

Para delimitar y calcular el porcentaje del área marcada se desarrolló una rutina de análisis con el programa de procesamiento y análisis de imágenes, ImageJ 1.46j (ver Anexo IV). En el mismo se aplicó un filtro para la eliminación del ruido y estandarización de la calidad de imagen, y se deconvolucionó el color de la imagen con el vector H&E DAB. Por último se determinó un umbral de color para cubrir el área correspondiente a la marcación con lectina BS-I. El porcentaje de marcación con lectina BS-I se calculó como la relación entre el número de píxeles incluidos en el área del umbral definido y el número total de píxeles de la imagen.

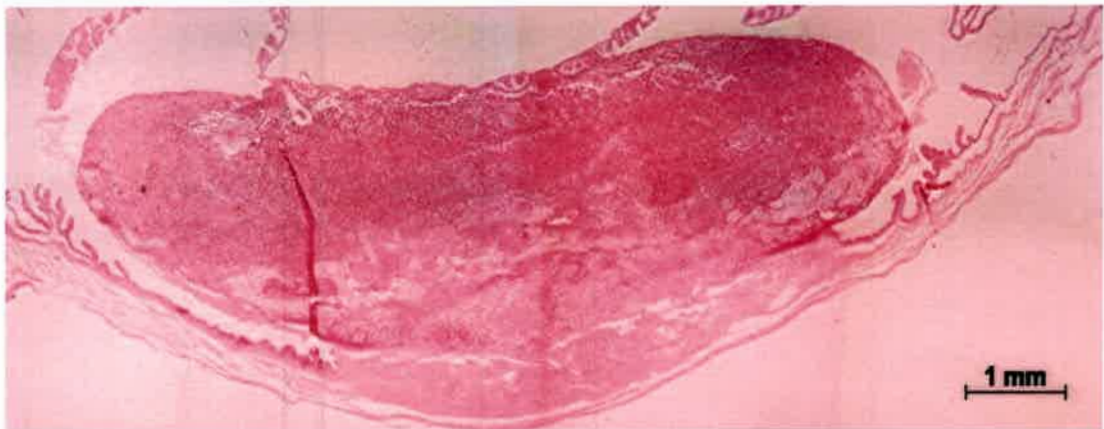


Figura 21: Ejemplo de fotomontaje de una placenta de roedor (H&E 40x).

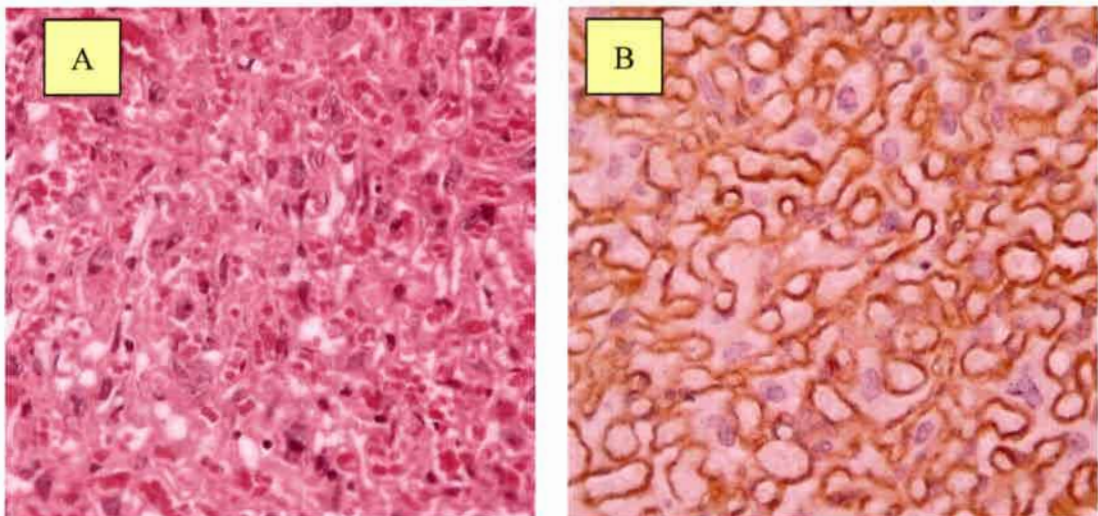


Figura 22: Imágenes de corte histológico del laberinto placentario. A) Tinción con H&E (400x). B) Marcación del endotelio vascular con lectina BS-I contratinción Hematoxilina (400x).

ESTADÍSTICA

Los datos fueron analizados mediante ANOVA de doble vía y se realizó como prueba *a posteriori* el test de DGC. Se constató que se cumpliesen los supuestos de homogeneidad de varianza (Test de Levene) y distribución normal. En todos los casos los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Para realizar los cálculos se utilizó el Software “InfoStat® versión 2012e (Di Rienzo *et al.*, 2012).

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{con } i = 1, 2; j = 1, 2; k = 1, \dots, n_{ij}$$

Donde:

Y_{ijk} = representa la respuesta de la k -ésima repetición en el i -ésimo nivel del factor A y la j -ésimo nivel de factor B.

μ = representa una media general.

α_i = el efecto que produce el i -ésimo nivel del factor A.

β_j = corresponde al efecto del j -ésimo nivel del factor B.

δ_{ij} = el efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles i del factor A y j del factor B.

ε_{ijk} = es el error aleatorio asociado a la observación ijk -ésima.

“Todo lo que somos es el resultado de lo que hemos
pensado; está fundado en nuestros
pensamientos y está hecho de nuestros
pensamientos”.

Buda

RESULTADOS

RESULTADOS

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Se evaluaron un total de 20 animales. El peso promedio de las hembras al inicio del desafío fue de 21,99 ($\pm 0,64$) mg, se observaron 157 fetos y el promedio de vesículas embrionarias por animal fue 7,85 ($\pm 1,57$).

El útero presentó un aspecto de collar de perlas. Cada una de las cuales se correspondía con una vesícula embrionaria que tenía un diámetro de 1,7 cm aproximadamente y una coloración rosada translúcida, que dejaba observar la presencia de un feto en su interior. Dentro de cada vesícula se visualizó una zona de color rojo oscuro que se correspondió con el sitio donde se observaba la presencia de la unidad feto placentario (Figura 23).

Las reabsorciones embrionarias y las alteraciones teratogénicas fueron determinadas por visualización directa de las muestras obtenidas de los animales en estudio. Solamente se observaron dos reabsorciones embrionarias y no se encontró ninguna malformación.

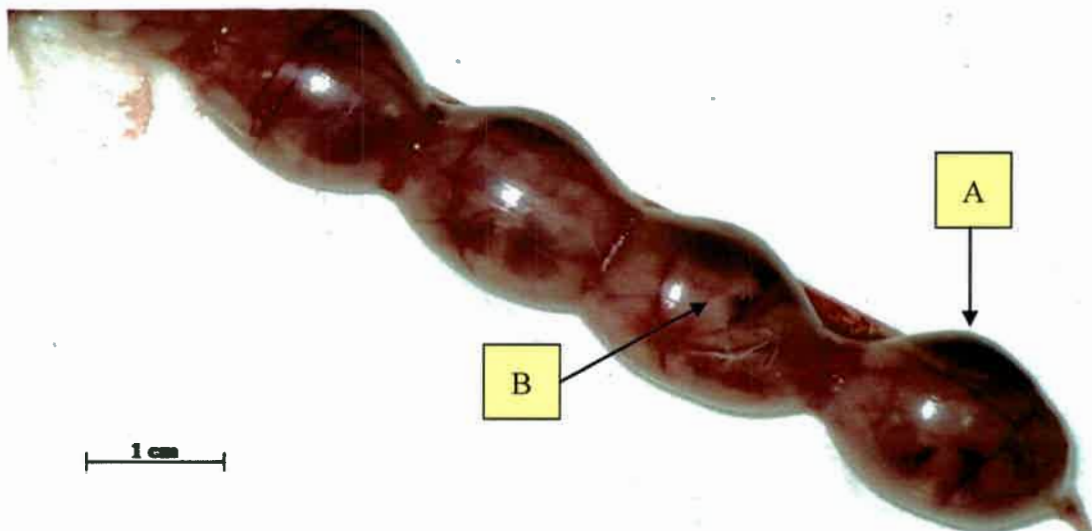


Figura 23: Útero de ratón, de 17 días de gestación, donde se observa la formación del collar de perlas. A) zona de color rojo oscuro que se corresponde la presencia de la placenta. B) vesícula embrionaria, donde se observa el feto en su interior.

Número de embriones, Peso fetal y Peso placentario

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en el número promedio y peso promedio de los embriones. Existió una disminución estadísticamente significativas en el peso placentario promedio de los grupos L-NAME y L-NAME + sildenafil, con respecto al resto de los grupos ($p= 0,0022$). Los datos se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Número de fetos, peso fetal y peso de la placenta de los diferentes grupos de estudio.

Grupo	Peso materno al inicio del tratamiento	Número de fetos	Peso fetal (mg)	Peso Placentario (mg)
vehículo	21,94 ($\pm 0,27$)	7,2 ($\pm 1,64$)	920 ($\pm 54,31$)	116 ($\pm 5,48$) ^a
sildenafil	22,10 ($\pm 0,82$)	7,4 ($\pm 0,89$)	882 ($\pm 85,85$)	116 ($\pm 5,48$) ^a
L-NAME	21,76 ($\pm 0,83$)	8 ($\pm 1,58$)	838 ($\pm 120,08$)	100 ($\pm 7,07$) ^b
L-NAME+ sildenafil	22,14 ($\pm 0,63$)	8,8 ($\pm 1,92$)	894 ($\pm 210,78$)	92 ($\pm 16,43$) ^b

Los valores se expresan como la media \pm desvío estándar. ANOVA con test *a posteriori* DGC. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p= 0,0022$).

Longitudes y diámetros fetales

Se observó una disminución estadísticamente significativa en el diámetro bilateral promedio de los grupos L-NAME y L-NAME + sildenafil con respecto a los otro dos grupo de estudio ($p= 0,0163$). No se observó diferencias significativas para las variables longitud cráneo rabadilla fetal promedio y longitud dorso-ventral fetal promedio para cada animal (Tabla 5).

Tabla 5: Valores promedios de las longitudes y diámetros fetales

Grupo	Longitud cráneo rabadilla (cm)	Diámetro bilateral (cm)	Longitud dorso-ventral (cm)
vehículo	1,94 (± 0,07)	0,75 (± 0,06) ^a	0,84 (± 0,04)
sildenafil	1,96 (± 0,13)	0,79 (± 0,03) ^a	0,85 (± 0,04)
L-NAME	1,89 (± 0,21)	0,71 (± 0,03) ^b	0,84 (± 0,05)
L-NAME+sildenafil	1,89 (± 0,15)	0,71 (± 0,03) ^b	0,80 (± 0,06)

Los valores se expresan como la media ± desvío estándar. ANOVA con test *a posteriori* DGC. Letras diferentes indican diferencias significativas (p= 0,0163).

Diámetros y Altura placentaria

En el análisis estadístico del diámetro menor placentario promedio y del mayor placentario promedio no se observaron diferencias significativas (Tabla 6). Si se observó una disminución estadísticamente significativa para la altura placentaria promedio (p= 0,0001) de los grupos L-NAME y L-NAME + sildenafil con respecto a los grupos vehículo y sildenafil. Los valores se visualizan en la Figura 24.

Tabla 6: Valores promedios de los diámetros placentarios

Grupo	Diámetro menor placentario (cm)	Diámetro mayor placentario (cm)
vehículo	0,80 (±0,02)	0,85 (±0,03)
sildenafil	0,80 (±0,04)	0,85 (±0,03)
L-NAME	0,76 (±0,03)	0,82 (±0,04)
L-NAME + sildenafil	0,75 (±0,03)	0,81 (±0,05)

Los valores se expresan como la media ± desvío estándar. ANOVA con test *a posteriori* DGC.

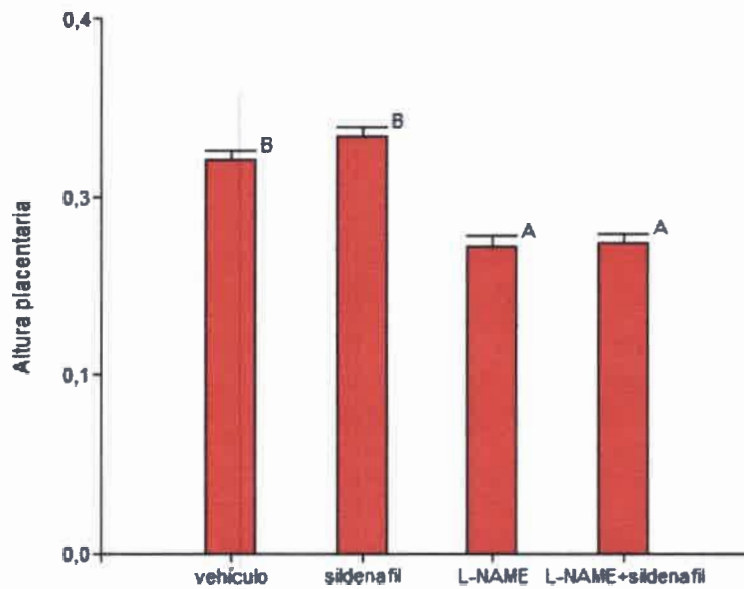


Figura 24: Comparación de la altura placentaria promedio. Los valores se expresan como la media \pm desvío estándar. ANOVA con test *a posteriori* DGC. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p=0,0001$).

Eficiencia placentaria

No se observaron diferencias significativas entre la eficiencia placentaria de los diferentes grupos en estudio (Tabla 7).

Tabla 7: Comparación de la eficiencia placentaria entre los distintos grupos de estudio

Grupo	Eficiencia placentaria
Vehículo	7,93 ($\pm 0,30$)
sildenafil	7,64 ($\pm 1,05$)
L-NAME	9,05 ($\pm 2,72$)
L-NAME + sildenafil	9,39 ($\pm 2,29$)

Los valores se expresan como la media \pm desvío estándar. ANOVA con test *a posteriori* DGC.

TÉCNICAS IMPLEMENTADAS

ESTRÉS OXIDATIVO

Daño oxidativo a lípidos

En la Tabla 8 se muestran los resultado de TBARS expresados en nmol de MDA/mg de proteína, si bien la concentración fue mayor para el grupo pre-eclampsia no se observaron diferencias estadísticas entre los grupos.

Tabla 8: Comparación de la peroxidación lipídica entre los distintos grupos de estudio

Grupo	nmol de MDA/mg proteína
Vehículo	204,13 (±32,43)
sildenafil	201,54 (±19,05)
L-NAME	213,77 (±25,19)
L-NAME + sildenafil	203,01 (±52,93)

Los valores se expresan como la media ± desvío estándar. ANOVA con test *a posteriori* DGC.

Actividad de enzimas antioxidantes

A pesar de que en los grupos vehículo y sildenafil la concentración de milimoles de catalasa por mg de proteína fue mayor que en los grupos tratados con L-NAME, no se observó diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos de estudio (Figura 25).

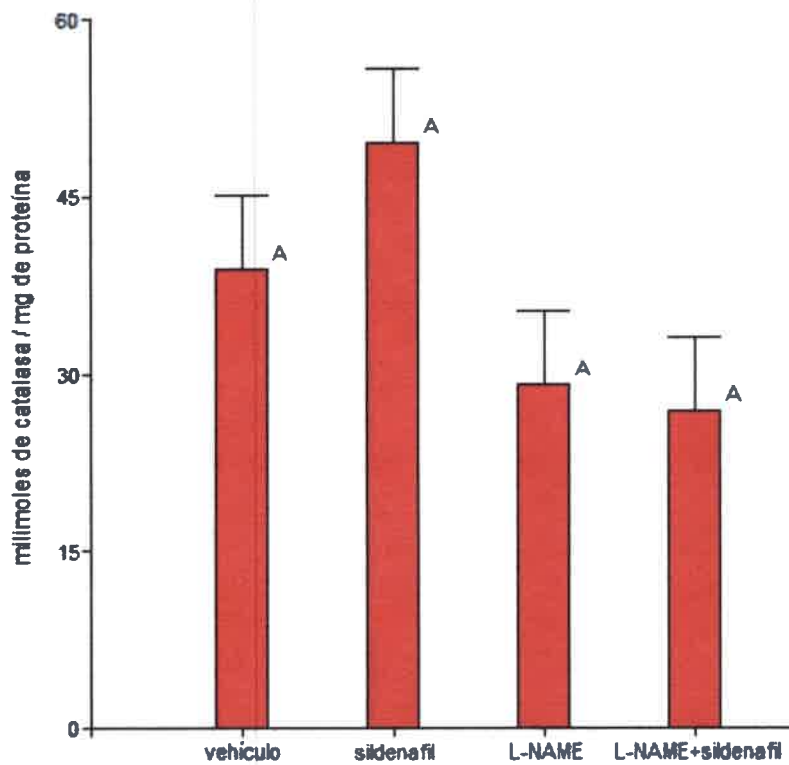


Figura 25: Comparación de la concentración de la enzima catalasa. Los valores se expresan como la media \pm desvío estándar. ANOVA con test *a posteriori* DGC. Letras diferentes indican diferencias significativas.

HISTOLOGÍA / HISTOPATOLOGÍA

En el análisis histológico de las muestras de placentas se evaluó la presencia de alteraciones patológicas mediante la tinción de hematoxilina/eosina y se valoró el porcentaje de endotelio fetal de la placenta a través de lectinhistoquímica.

Coloración de Hematoxilina/Eosina

Se evaluó toda la región correspondiente al laberinto placentario, en ninguno de los grupos estudiados se observó necrosis, edema o infiltrado de células inflamatorias en esta zona placentaria (Figura 26).

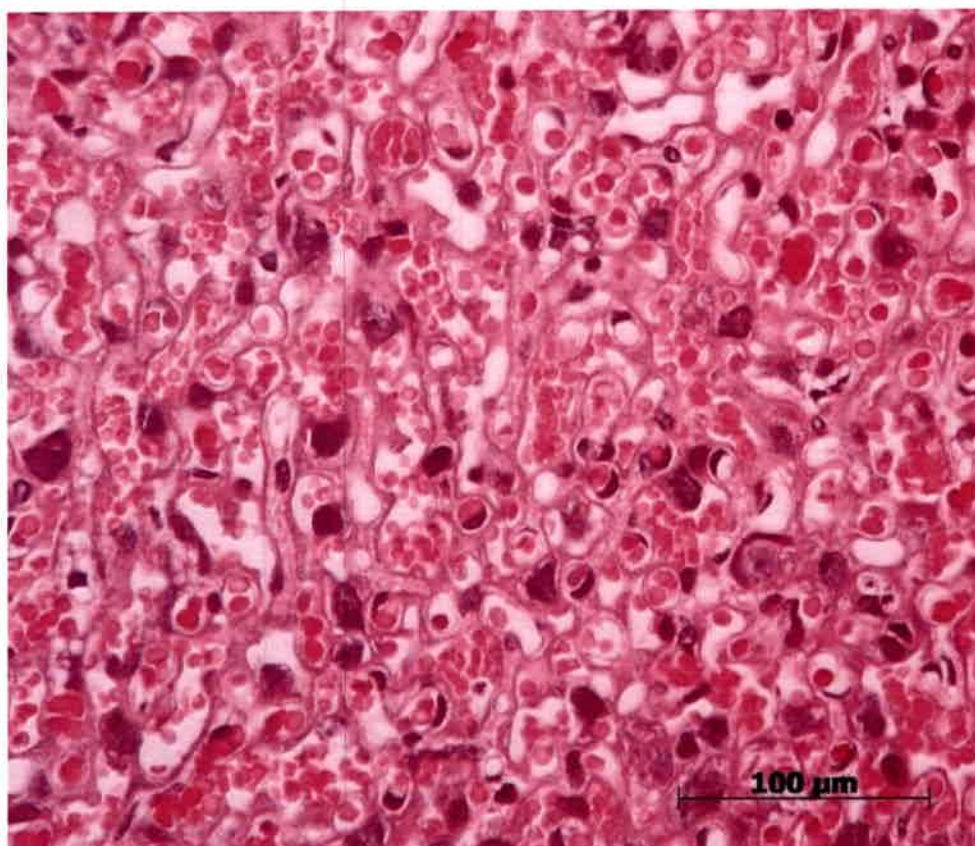


Figura 26: Imágenes de corte histológico del laberinto placentario de un animal perteneciente al grupo sildenafil. Fotografía representativa del grupo en estudio (H&E 400x).

Lectinhistoquímica

La marcación del endotelio fetal del laberinto placentario mediante la técnica de lectinhistoquímica, permitió comparar el desarrollo de vasos sanguíneos en los distintos grupos de estudio. En la Figura 27 (a-d) se aprecia la marcación de endotelio fetal con lectina BS-I. A través de la rutina de análisis desarrollada con el programa ImageJ se delimitó y calculó el área marcada (Figura 27, e-h).

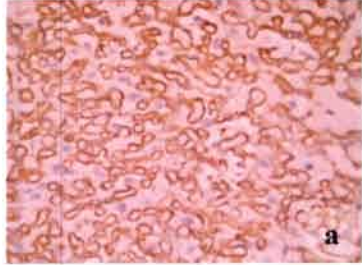
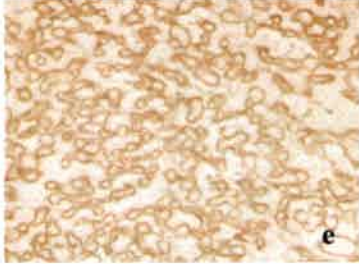
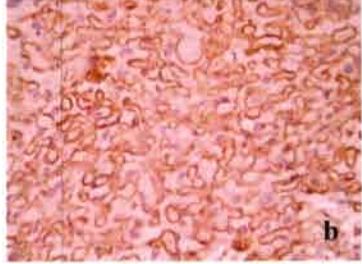
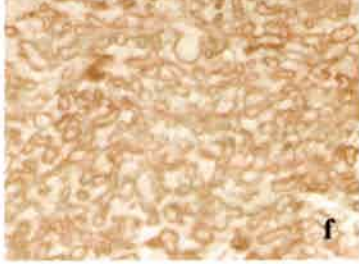
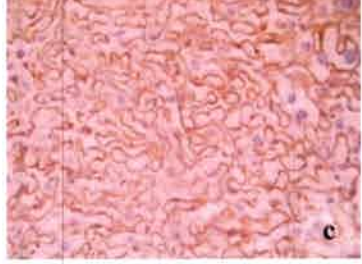
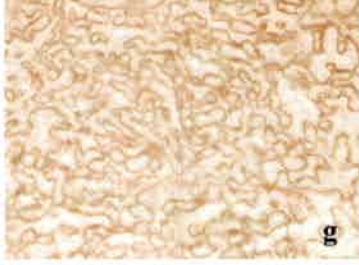
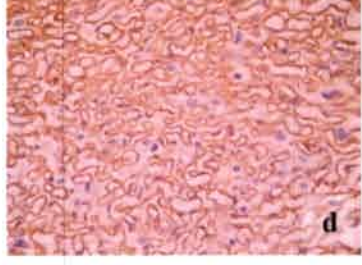

<p>vehículo 43,82 ($\pm 1,32$)^a</p>		
<p>sildenafil 42,88 ($\pm 3,30$)^b</p>		
<p>L-NAME 37,36 ($\pm 1,73$)^a</p>		
<p>L-NAME + sildenafil 43,54 ($\pm 3,51$)^a</p>		

Figura 27: Imágenes de corte histológico del laberinto placentario marcado con lectina BS-I. a-d: Marcación del endotelio vascular con lectina BS-I con tinción Hematoxilina (400x). e-h: Imagen resultante del procesamiento con el programa ImageJ. El color marrón indica marcación con lectina BS-I y es el área calculada por el programa como porcentaje del área marcada. Fotografía representativa del grupo en estudio. Los valores se expresan como la media \pm desvío estándar. ANOVA con test *a posteriori* DGC. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p = 0,0040$).

Para estimar el porcentaje de endotelio fetal se realizó el cociente entre el área que ocupa la imagen y el área marcada con la lectina BS-I. Se observó una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de endotelio fetal en el grupo L-NAME ($p=0,0040$) (Figura 28).

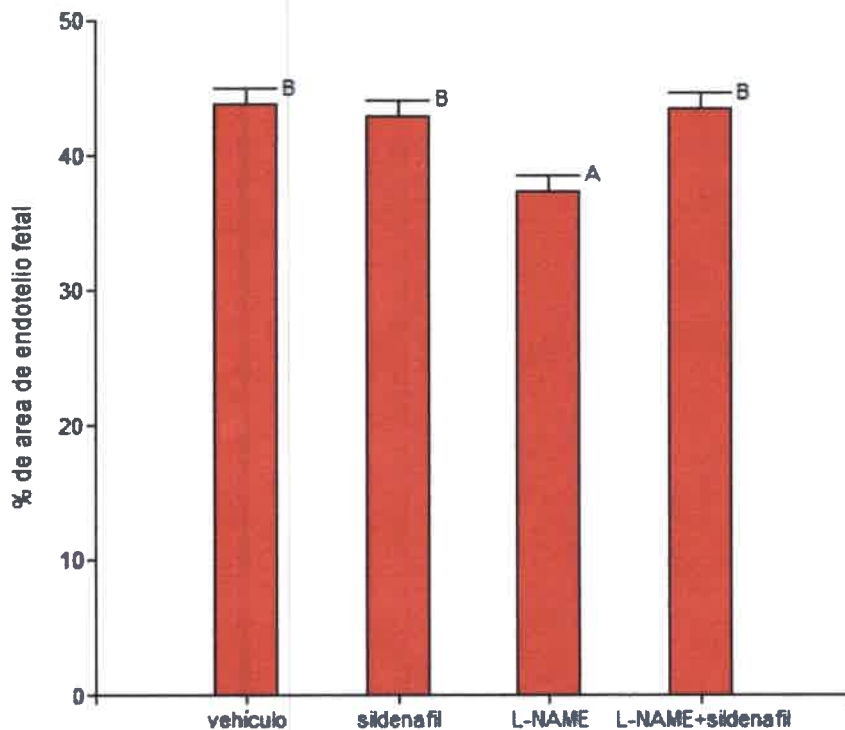


Figura 28: Porcentaje de área marcada con lectina BS-I. Los valores se expresan como la media \pm desvío estándar. ANOVA con test *a posteriori* DGC. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p=0,0040$).

“El arte es la expresión de los más profundos pensamientos por el camino más sencillo”.

Albert Einstein.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Para evaluar el efecto del sildenafil sobre la vascularización y el estrés oxidativo de la placenta en un modelo murino, la dosis utilizada en este trabajo resultó óptima ya que permitió evaluar sus efectos sin ocasionar efectos secundarios en las hembras, esta dosis está en concordancia con la aplicada por Yildirim *et al.*, (2010) quienes informaron en un estudio preliminar que 10 mg/kg de citrato de sildenafil era la dosis más eficaz. Por otro lado, un estudio realizado por Abbott *et al.*, (2004) reporta que en ratas gestantes tratadas con una dosis mayor a la utilizada en este trabajo (de 60 mg/kg de citrato de sildenafil), la toxicidad mínima se manifestó como una disminución en el número de crías viables y menor peso corporal de las crías al nacer. Además, Sasser y Baylis (2010) encontraron que en ratas tratadas con 3 dosis distintas de citrato de sildenafil, no estuvo comprometida la expansión del volumen plasmático cuando los animales fueron tratados con 10 o 50 mg/kg. Estas dos dosis ocasionaron un aumento de los niveles circulantes de GMPc, pero sin disminuir la presión arterial y no fueron suficientes para aumentar los niveles de GMPc en el tejido. El tercer tratamiento con 90 mg/kg de citrato de sildenafil elevó los niveles de GMPc en la aorta y la médula renal interna y disminuyó el volumen plasmático.

La comparación del desarrollo de los vasos sanguíneos en los distintos grupos de estudio se realizó mediante la marcación de las células del endotelio fetal utilizando lectina biotinilada BS-I de *Griffonia simplicifolia*. Estudios anteriores llevados a cabo por diferentes grupos de investigación indicaron que esta lectina se une específicamente al endotelio murino como se demostró en tejidos fetales de ratón (Laitinen, 1986), al endotelio vascular renal y uterino en ratas (Schulte *et al.*, 1983; Goodger y Rogers, 1993) y al endotelio de la placenta de rata (Doherty *et al.*, 2003). En este estudio la comparación de la intensidad y distribución de la marcación positiva se realizó con una rutina de análisis de imágenes desarrollada con el programa ImageJ, sometiendo a las imágenes a un procedimiento de análisis automatizado. Neres *et al.*, (2008), realizaron un procedimiento similar para

comparar el área vascular de la placenta por lectinhistoquímica de ratones infectados con *Plasmodium berghei*.

Durante el desarrollo de este estudio se observó que el tratamiento con sildenafil de ratones con gestaciones normales no disminuyó el número de embriones viables o el peso fetal promedio, no alteró los parámetros morfométricos fetales ni ocasionó malformaciones fetales. Los diámetros placentarios y el peso placentario no mostraron diferencias, ni se observaron alteraciones patológicas en la placenta. Tampoco se observaron diferencias estadísticas en la peroxidación lipídica o en las concentraciones de la enzima catalasa en los homogenatos del tejido placentario entre el grupo tratados con sildenafil y el grupo vehículo. El análisis histológico del laberinto placentario en todos los animales en estudio, mostró la ausencia de edema, necrosis o inflamación.

Un preparado histológico del tejido placentario de cada animal, se procesó con lectina BS-I para facilitar la diferenciación de los capilares fetales (por la presencia de endotelio) de los espacios de sangre materna (ausencia de endotelio). Los vasos sanguíneos de origen fetal valorados por el porcentaje de marcación del endotelio fetal con lectina BS-I fueron similares entre los grupos vehículo y sildenafil. Por los resultados antes mencionados se puede afirmar que el sildenafil no produce alteración del crecimiento fetal, ni modifica el desarrollo o formación de la placenta en ratones gestantes normales. Estos resultados concuerdan con los de Sasser y Baylis (2010), que demostraron que en ratas con gestaciones normales el uso de sildenafil no induce alteraciones fetales, ni cambios placentarios y tampoco modifica el número, el peso o la longitud de los conceptos.

En los últimos años la investigación en animales ha demostrado que el NO conduce a la relajación del músculo liso vascular, siendo un potente modulador de flujo sanguíneo uterino. El sildenafil aumenta los niveles de NO en el músculo liso vascular, observándose un efecto vasodilatador (Wareing *et al.*, 2006). Este efecto no se debe a un incremento en su producción sino a la disminución de la degradación del NO por la inhibición de la enzima 5-PDE (Zoma *et al.*, 2004). Por lo tanto, para poder observar los efectos del sildenafil sobre la vascularización de la placenta en

este trabajo se utilizó un modelo de pre-eclampsia, donde la concentración de NO estuviera disminuida y el flujo sanguíneo placentario alterado.

La pre-eclampsia es un síndrome que se define como un desorden multisistémico. Es un trastorno que se produce en dos etapas, la primera se caracteriza por una falla en la remodelación completa de los canales de gran diámetro de las arterias espirales, con una reducción del flujo sanguíneo placentario. La segunda etapa es aquella en que la reducción de la perfusión sanguínea induce un estado de hipoxia (Roberts y Gammill, 2005; Ramesar *et al.*, 2010). Roberts y Lain (2002) describieron que en ésta etapa se disminuye la secreción de factores angiogénicos, como el VEGF y el factor de crecimiento placentario.

El tratamiento con L-NAME en roedores altera la vía de señalización del NO, reduce la formación de NO y produce una inadecuada perfusión uterina, originando cambios patológicos similares a los observados en mujeres con pre-eclampsia (Cauli *et al.*, 2010).

El modelo utilizado en esta tesis se basó en el trabajo de Ma *et al.*, (2010), quienes establecieron un modelo murino de pre-eclampsia con la administración de L-NAME. Además, estos autores informaron que se puede inducir la pre-eclampsia en ratones en diferentes estadios de la gestación. Los síntomas de la pre-eclampsia que ocurren durante la gestación temprana afectan más el desarrollo de la placenta y aquellos síntomas que se desarrollan durante la gestación tardía impactan más en la madre y el feto. Otra condición que se tuvo en cuenta para la selección del modelo de pre-eclampsia, fue que no alterara o inhibiera la acción del citrato de sildenafil. Maharaj *et al.*, (2009) en un estudio sobre los efectos y mecanismos de acción del sildenafil en las arterias coriónicas humanas demostraron que el L-NAME no inhibe la vasodilatación inducida por el citrato de sildenafil.

Al evaluar los parámetros relacionados al crecimiento fetal en el modelo de pre-eclampsia, se constató una disminución estadísticamente significativa del diámetro bilateral. Además, si bien no existieron diferencias estadísticas en el peso fetal y la longitud cráneo rabadilla, se observó una disminución en estos parámetros del grupo tratado con L-NAME con respecto al grupo vehículo. Hallazgos similares

relacionados con el peso fetal fueron observados por Ramesar *et al.*, (2011), quienes encontraron una disminución del peso fetal en ratas Sprague-Dawley tratadas con L-NAME. Por otro lado, Ma *et al.*, (2010), comprobaron que los cambios patológicos asociados con la pre-eclampsia en ratones hembras tratadas con L-NAME, podrían causar la disfunción placentaria, la IUGR y la muerte fetal posterior. Con respecto a los parámetros utilizados para evaluar el desarrollo placentario, la disminución del peso y la altura placentaria de los grupos tratados con L-NAME fueron estadísticamente significativas. En cambio, aunque los diámetros placentarios fueron menores en estos grupos las diferencias no fueron significativas. Estos resultados son similares a los encontrados por Ramesar *et al.*, (2011), quienes determinaron una disminución del peso placentario en ratas tratadas con L-NAME. También coinciden con los resultados hallados por Ma *et al.*, (2010) que observaron en ratones una disminución del peso placentario en el día 18 de gestación, cuando se indujo la pre-eclampsia con L-NAME en las etapas temprana y media de la preñez.

Por otro lado, las concentraciones de la enzima catalasa encontradas en los homogenatos del tejido placentario fueron menores en los grupos tratados con L-NAME, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además, los animales pertenecientes al grupo pre-eclampsia presentaron un aumento no significativo de la peroxidación lipídica con respecto a los otros grupos. Este resultado concuerda con lo observado por Borrego-Díaz *et al.*, (2008), quienes demostraron que la peroxidación lipídica en gestaciones de mujeres con pre-eclampsia es mayor a la observada en mujeres con gestaciones normales. Estos peróxidos de lípidos se incrementan principalmente en la placenta debido a la disrupción de la membrana por ERO. Yang *et al.*, (2011), también encontraron un aumento estadísticamente significativo de la concentración de MDA en placenta de rata de 22 días de gestación con pre-eclampsia.

En este estudio también se estableció que la dosis empleada de L-NAME no causó alteraciones patológicas en el tejido placentario, ya que al realizar el estudio histopatológico pudimos constatar la ausencia de necrosis, edema o infiltrado de

células inflamatorias en las secciones del laberinto placentario de los animales de los grupos tratados.

La evaluación de los capilares fetales, a través del porcentaje de endotelio fetal de la placenta marcado con lectina BS-I, permitió comparar el desarrollo de vasos sanguíneos en los distintos grupos de estudio. Observándose una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de endotelio fetal en el grupo L-NAME. La disminución en el porcentaje de células del endotelio del laberinto placentario junto a la disminución del área y del peso de la placenta, probablemente sean debido a una reducción del flujo sanguíneo, producto de un estado de hipoxia placentaria. La disminución del peso fetal, del peso placentario, de la altura placentaria y del porcentaje de endotelio fetal, demuestran que la aplicación del L-NAME induce una reducción del área vascular fetal y, en consecuencia, disminuye el flujo sanguíneo placentario y el suministro de oxígeno al feto, provocando una IUGR. Este efecto podría estar mediado por una disminución del NO en el trofoblasto fetal debido al efecto inhibitorio del L-NAME sobre la NOS. Es bien conocido que el NO es una molécula de gran importancia en la regulación de los cambios adaptativos que ocurren en los vasos sanguíneos uterinos y placentarios durante la preñez (Zhu *et al.*, 2005).

Finalmente el modelo murino de pre-eclampsia inducido con L-NAME y tratado con sildenafil, no mostró cambios patológicos maternos o fetales, ni tampoco variación estadística en el número de vesículas embrionarias viables. Von Dadelszen *et al.*, (2011), reportaron que el tratamiento con sildenafil en mujeres con IUGR, tampoco produjo efectos secundarios adversos maternos.

Las variables de caracterización morfométricas y las utilizadas para valorar el estrés oxidativo no exhibieron diferencias estadísticas, aunque se observó una disminución de la peroxidación lipídica en el grupo que se indujo a la pre-eclampsia con L-NAME y luego fue tratado con sildenafil. Esta disminución en la peroxidación lipídica también fue evidenciada en otros tejidos debido a la vasoconstricción e hipertensión. Por ejemplo, en la microcirculación renal Abdel-latif *et al.*, (2013), observaron que el tratamiento con Sildenafil redujo significativamente los niveles de

glutación reducido renal, malondialdeído, nitrito/nitrato y catalasa en ratas con daño renal debido a la vasoconstricción ocasionada por el tratamiento de ciclosporina A.

Sin embargo, se observó un aumento estadísticamente significativo de las células del endotelio del laberinto placentario marcadas con la lectina BS-I, en el grupo L-NAME + sildenafil, indicando que el uso de sildenafil contrarrestó el efecto del L-NAME sobre el trofoblasto placentario. Wareing *et al.*, (2006) demostraron que el citrato de sildenafil, utilizado como agente terapéutico, puede mejorar la perfusión del miometrio en los embarazos con restricción del crecimiento fetal, promoviendo la vasodilatación de las arterias pequeñas del miometrio, disminuyendo la resistencia periférica, y aumentando el flujo dentro del lecho útero-placentario. Así también, Ramesar *et al.*, (2012) reportaron que el sildenafil mejora el flujo sanguíneo de la arteria uterina y el desarrollo endometrial en mujeres sometidas a fertilización *in vitro*. Estos efectos son beneficiosos sobre parámetros fetales y vasculares en ratas hipertensas embarazadas. También se demostró que el uso de este fármaco mejora la vasodilatación y la función endotelial de los vasos del miometrio en embarazos complicados por IUGR. Maharaj *et al.*, (2009) informaron que el sildenafil posee un efecto vasodilatador similar en la circulación feto-placentaria. Explicando, en parte, los efectos beneficiosos observados en el crecimiento fetal en los estudios experimentales de asfixia e hipoxia durante el parto. Si bien la transferencia placentaria de citrato de sildenafil no ha sido cuantificada, debido a sus características químicas, es probable que esta sustancia atraviese fácilmente la placenta desde la madre hacia el feto.

En conjunto los resultados de esta tesis indican que el tratamiento de hembras gestantes con sildenafil puede ser utilizado sin efectos adversos para el concepto y su uso como tratamiento en un modelo de pre-eclampsia es prometedor.

“Todas las teorías son legítimas y ninguna tiene importancia.
Lo que importa es lo que se hace con ellas”.

Jorge Luis Borges

CONCLUSIÓN

CONCLUSIONES

- El uso de sildenafil no alteró el número de vesículas embrionarias viables, no influyó en el desarrollo de los embriones, ni disminuyó su tamaño, tampoco generó lesiones o malformaciones.
- Se demostró que la aplicación del L-NAME indujo una disminución del área vascular fetal y redujo tanto el flujo sanguíneo placentario como el suministro de oxígeno al feto, provocando una restricción del crecimiento intrauterino.
- Se demostró que el sildenafil podría ser utilizado sin efectos adversos para el concepto, en el tratamiento de hembras gestantes complicadas con pre-eclampsia.
- Debido a que el tratamiento con sildenafil aumentó el área vascular fetal en el laberinto su uso en el tratamiento de la pre-eclampsia es prometedor y se deberían realizar ensayos en mujeres gestantes.



Motta Carlos Eugenio

“Si la escritura es honesta no puede ir separada del hombre que la ha escrito”.

Tennessee Williams

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-latif, R. G., Morsy, M. A., El-Moselhy, M. A., & Khalifa, M. A. (2013). Sildenafil protects against nitric oxide deficiency-related nephrotoxicity in cyclosporine a treated rats. *European Journal of Pharmacology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.02.039>.
- Ahmed, A., Singh, J., Khan, Y., Seshan, S. V., & Girardi, G. (2010). A new mouse model to explore therapies for preeclampsia. *PLoS ONE*, 10.
- Andronowska, A., Chruściel, M., & Calka, J. (2008). The localization and expression of NADPH- diaphorase and isoforms of nitric oxide synthase in the porcine gravid uterus. *Reproductive Biology*, 8 (3), 263-278.
- AVMA. (2007). *AVMA Guidelineson (Formerly report of the AVMA panel on euthanasia)*.
- Bany, B., & Crosse, J. (2006). Post-implantation mouse conceptuses produce paracrine signals that regulate the uterine endometrium undergoing decidualization. *Developmental Biology*, 294, 445–456.
- Bell, E. (2004). A bad cambination. *Nature Reviews Immunology*, 4, 927.
- Borrego-Díaz, E., Rosales, J. C., Proverbio, T., Teppa-Garrán, A., Andaluz, R., Abad, C., Marín, R., & Proverbio, F. (2008). Effect of placental hypoxia on the plasma membrane Ca-atpase (PMCA) activity and the level of lipid peroxidation of syncytiotrophoblast and red blood cell ghosts. *Placenta*, 29, 44-50.
- Buege, J., & Aust, S. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* (52), 302-310.
- Burton, G. J., & Jauniaux, E. (2011). Oxidative stress. *Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 25 (3), 287-299.
- Cauli, O., Herraiz, S., Pellicer, B., Pellicer, A., & Felipo, V. (2010). Treatment with sildenafil prevents impairment of learning in rats born to pre-eclamptic mothers. *Neuroscience*, 171, 506-512.

- Chance, B. (1954). Special methods: catalase. *Interscience*, 408-424.
- Cross, J. C., Hemberger, M., Lu, Y., Nozaki, T., Whiteley, K., Asutani, M., & Adamson, S. L. (2002). Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 187, 207-212.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2012). Patent No. URL <http://www.infostat.com.ar>. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dilworth, M. R., & Sibley, C. P. (2013). Review: Transport across the placenta of mice and women. *Placenta*, Volume 34, Supplement, S34-S39.
- Doherty, C. B., Lewis, R. M., Sharkey, A., & Burton, G. J. (2003). Placental composition and surface area but not vascularization are altered by maternal protein restriction in the rat. *Placenta*, 24, 34-38.
- Dussault, S., Fritz, M., Ménard, C., Michaud, S. E., Haddad, P., Groleau, J., Turgeon, J., Perez, G., & Rivard, A. (2009). Sildenafil increases endothelial progenitor cell function and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic apolipoprotein e -deficient mice. *Hypertension*. (54), 1043-1049.
- El-Far, M., El-Motwally, A.-G., Hashem, I., & Bakry, N. (2009). Biochemical role of intravaginal sildenafil citrate as a novel antiabortive agent in unexplained recurrent spontaneous miscarriage: first clinical study of four case reports from Egypt. *Clinical chemistry and laboratory medicine*, 47 (11), 1433-1438.
- Everett, T. R., & Lees, C. C. (2012). Beyond the placental bed: Placental and systemic determinants of the uterine artery Doppler waveform. *Placenta*, 893-901.
- Furuya, M., Kurasawa, K., Nagahama, K., Kawachi, K., Nozawa, A., Takahashi, T., & Aoki, I. (2011). Disrupted balance of angiogenic and antiangiogenic signalings in preeclampsia. *Journal of Pregnancy*, 10.
- Georgiades, P., Ferguson-Smith, C., & Bur, G. J. (2002). Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta*, 23, 3-19.

- Goodger, A., & Rogers, P. (1993). Uterine endothelial cell proliferation before and after embryo implantation in rats. *Journal of reproduction & fertility*, 99, 451–457.
- Hale, S. A., Jones, C. W., Osol, G., Schonberg, A., Badger, G. J., & Bernstein, I. M. (2010). Sildenafil increases uterine blood flow in nonpregnant nulliparous women. *Reproductive Sciences*, 17 (4), 358-365.
- Hong, H., Sun, J., & Cai, W. (2009). Multimodality imaging of nitric oxide and nitric oxide synthases. *Free Radical Biology & Medicine*, 47, 684-698.
- Khan, R. N., Hamoud, H., Warren, A., Wong, L. F., & Arulkumaran, S. (2004). Relaxant action of sildenafil citrate (Viagra) on human myometrium of pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191, 315-321.
- Laitinen, L. (1986). Griffonia simplicifolia lectins bind specifically to endothelial cells and some epithelial cells in mouse tissues. *Histochemical Journal*, 19, 225–234.
- Ma, R., Sun, M., & Zang, Z. (2010). Effects of preeclampsia-like symptoms at early gestational stage on feto-placental outcomes in a mouse model. *Chinese Medical Journal*, 123 (6), 707-712.
- Maharaj, C. H., O'Toole, D., Lynch, T., Carney, J., Jarman, J., D Higgins, B., Morrison, J. J., & Laffey, J. G. (2009). Effects and mechanisms of action of sildenafil citrate in human chorionic arteries. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7:34 doi:10.1186/1477-7827-7-34.
- Myatt, L. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species and functional adaptation. *Placenta*, 31, 66-69.
- Neres, R., Marinho, C. R., Goncalves, L. A., Catarino, M. B., & Penha-Goncalves, C. (2008). Pregnancy outcome and placenta pathology in plasmodium berghei anka infected mice reproduce the pathogenesis of severe malaria in pregnant Women. *PLoS ONE*, 3, 1-11.
- Ogando, D. G., Paz, D., Cella, M., & Franchi, M. (2003). The fundamental role of increased production of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced embryonic resorption in mice. *Reproduction*, 125, 95-110.

Oliveira, L. G., Karumanchi, A., & Sass, N. (2010). Pré-eclâmpsia: estresse oxidativo, inflamação e disfunção endotelial. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, 32 (12), 609-616.

Perez, G. R. (2007). Fundamentos del trabajo con animales de laboratorio en proyectos de investigación. Edición Electrónica. *Revista del Hospital J. M. Ramos Mejía*, XII (3).

Pringle, K. G., Kind, K. L., Sferruzzi-Perri, A. N., Thompson, J. G., & Roberts, C. T. (2010). Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. *Human Reproduction Update*, 16 (4), 415-431.

Ramesar, S. V., Gathlram, P., Moodley, J., & Mackraj, I. (2012). Treatment of preeclampsia: implementing research findings. *Obstetrics & Gynecology*, 1-6.

Ramesar, S. V., Mackraj, I., Gathiram, P., & Moodley, J. (2010). Sildenafil citrate improves fetal outcomes in pregnant, L-NAME treated, sprague-dawley rats. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 149, 22-26.

Reyna-Villasmil, E., Torres-Cepeda, D., Peña-Paredes, E., Mejías-Montilla, J., Reyna-Villasmil, N., & González-Rodríguez, P. (2008). Efecto del citrato de sildenafil sobre el flujo sanguíneo de las arterias uterina, umbilical y cerebral media fetal en preeclámpicas. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 68 (3), 187-194.

Reynolds, L. P., Caton, J. S., Redmer, D. A., Grazul-Bilska, A. T., Vonnahme, K. A., Borowicz, P. P., Luther, J. S., Wallace, J. M., Wu, G., & Spencer, T. E. (2006). Evidence for altered placental blood flow and vascularity in compromised pregnancies. *The Journal of Physiology*, 572 (1), 51-58.

Rivas, P. C., Rodríguez-Márquez, J. M., & Hernández, A. (2006). Número de vasos sanguíneos y expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular y de la óxido nítrico sintasa endotelial e inducida en la alantoides ovina. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 16 (4), 347-352.

Roberts, J. M., & Gammill, H. S. (2005). Preeclampsia: recent insights. *Hypertension*, 46 (6), 1243-9.

- Sasser, J. M., & Baylis, C. (2010). Effects of sildenafil on maternal hemodynamics and fetal growth in normalrat pregnancy. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298, 433-438.
- Schulte, B., & Spicer, S. (1983). Histochemical evaluation of mouse and rat kidneys with lectin-horseradish peroxidase conjugates. *American Journal of Anatomy*, 168, 345-362.
- Sheppard, S. J., & Khalil, R. A. (2010). Risk factors and mediators of the vascular dysfunction associated with hypertension in pregnancy. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*, 10 (1), 33-52.
- Sher, G., & Fisch, J. D. (2002). Effect of vaginal sildenafil on the outcome of in vitro fertilization (IVF) after multiple IVF failures attributed to poor endometrial development. *Fertility and Sterility*, 78 (5), 1073-1076.
- Soares, M. J., Müller, H., Orwig, K. E., Peters, T. J., & Dai, G. (1998). The uteroplacental prolactin family and pregnancy. *Biology of Reproduction*, 58 273-284.
- Sprague, B., Chesler, 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 stress forces on endothelial cells. *The International Journal of Developmental Biology*, 54 (2-3), 331-339.
- Suárez González, J. A., Gutiérrez Machado, M., Cabrera Delgado, M. R., Corrales Gutiérrez, A., & Salazar, M. E. (2011). Predictores de la preeclampsia/eclampsia en un grupo de gestantes de alto riesgo. *Revista Cubana de Obstetricia y Ginecología*, 154-161.
- Suzuki, T., Mori, C., Yoshikawa, H., Miyazaki, Y., Kansaku, N., Tanaka, K., Morita, H., & Takizawa, T. (2009). Change in nitric oxide production levels and expression of nitric oxide synthase isoforms in the rat uterus during pregnancy. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70 (10), 2163-2166.
- Valdes, G., Erices, R., Chacón, C., & Corthon, J. (2008). Angiogenic, hyperpermeability and vasodilator network in utero-placental units along pregnancy in the guinea-pig (*Cavia porcellus*). *Reproductive Biology and Endocrinology*, 6-13.

von Dadelszen, P., Dwinnell, S., Magee, L. A., Carleton, B. C., Gruslin, A., Lee, B., Lim, K. I., Liston, R. M., Miller, S. P., Rurak, D., Sherlock, R. L., Skoll, M. A., Wareing, M. M., & Baker, P. N. (2011). Sildenafil citrate therapy for severe early-onset intrauterine growth restriction. *An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 118:624–628.

Vonnahme, K. A., & Ford, S. P. (2004). Differential expression of the vascular endothelial growth factor-receptor system in the gravid uterus of yorkshire and meishan pigs. *Biology of Reproduction*, 71, 163-169.

Wareing, M., Myers, J. E., O'Hara, M., Kenny, L. C., Taggart, M. J., Skillern, L., Machin, I., & Baker, P. N. (2006). Phosphodiesterase-5 inhibitors and omental and placental small artery function in normal pregnancy and preeclampsia. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 127 41-49.

Yang, X., Guo, L., Sun, X., Chen, X., & Tong, X. (2011). Protective effects of hydrogen-rich saline in preeclampsia rat model. *Placenta*, 32, 681-686.

Yildirim, A., Ersoy, Y., Ercan, F., Atukeren, P., Gumustas, K., Uslu, U., & Alican, I. (2010). Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 23 , 215–221.

Zoma, W. D., Baker, R. S., & Clark, K. E. (2004). Effects of combined use of sildenafil citrate (Viagra) and 17 β -estradiol on ovine coronary and uterine hemodynamics. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190, 1291-1297.

Zhu, K. Q., Engrav, L. H., Armendariz, R., Muangman, P., Klein, M. B., Carrougher, G. J., Deubner, H., & Gibran, N. S. (2005). Changes in VEGF and nitric oxide after deep dermal injury in the female, red Duroc pig—further similarities between female, Duroc scar and human hypertrophic scar. *Journal of the International Society for Burn Injuries*, 31, 5-10.



Motta Carlos Eugenio

ANEXOS

ANEXO I

BUFFER PARA ESTRES OXIDATIVO

Materiales

Para la preparación de 20 ml de buffer para estrés oxidativo (Tris base 20 mM, pH: 7.6) se pesaron:

- EDTA 1 mM 7,45 mg
- KCl 150 mM 223,6 mg
- Tris base 20 mM 48,44 mg
- Sacarosa 500 mM 3,423 g.
- Mercaptoetanol 1 mM 1,4 μ l

Se colocaron en un matraz y se agregó agua destilada hasta completar 20 ml.

Se trasvasó a un vaso de precipitado.

Se midió el pH de la solución y se llevó a pH 7,6 con ácido clorhídrico 1 mM.

ANEXO II

PROTOCOLO MÉTODO DE BRADFORD. MEDICIÓN DE PROTEINAS

Reactivo de Bradford

Disolver 100 mg de Azul Brillante de Coomasie G250 (Sigma®, B-5133) en 50 ml de Etanol (Cicarelli, PM 46,07) al 95%. Se agregó 100 ml de Ácido fosfórico (Merck) 85% v/v. Se llevó a 1 litro con agua destilada y se dejó toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad. Se filtró y se guardó en frasco color caramelo.

Curva y dosaje de proteínas

Se empleó como estándar una solución de Seroalbúmina Bovina-BSA-(Sigma®, A-7030) de 1 mg/ml. Se realizaron diluciones del estándar como se detalla a continuación:

	µl de BSA	µl de NaOH	µl de Agua destilada	ml de Bradford	Concentración de Proteína
Blanco	0	50	50	1	0 µg/µl
1	2,5	50	47,5	1	2,5 µg/µl
2	5	50	45	1	5 µg/µl
3	7,5	50	42,5	1	7,5 µg/µl
4	10	50	40	1	10 µg/µl
5	12,5	50	37,5	1	12,5 µg/µl
6	15	50	35	1	15 µg/µl
11	50	50	0	1	¿?

Se colocaron los estándares y las muestras por triplicado en tubos de hemolisis, se mezclaron los reactivos, se trasvasaron a cubetas plásticas para espectrofotometría y se midieron con un espectrofotómetro Jasco v630bio a 595 nm a los 10 minutos de iniciada la reacción. Se consideraron como válidos aquellos valores de las muestras que tenían una absorbancia comprendida entre los tubos 3 y 5 de la curva patrón. Si los valores estaban fuera de este rango se realizaron diluciones hasta que la absorbancia estuviera dentro de este rango. La concentración de las muestras se obtuvo interpolando la absorbancia obtenida con respecto a la curva estándar. En los casos en que se hicieron diluciones se multiplicaron los valores por el factor de dilución.

ANEXO III

PROTOCOLO DAÑO OXIDATIVO A LÍPIDOS TÉCNICA DE TBARS

Soluciones

- Ácido tricloroacético (TCA) 15%
- Ácido 2-thiobarbiturico (TBA) 0,375%
- Tetrametozipropano (TMP)
- Malondialdehído (MDA)
- Preparación de MDA

Mezclar 200 µl de TMP con 108 µl de HCl 1M en un tubo protegido de la luz, e incubar en estufa a 37°C., durante 30 minutos. Vorterear cada 10 minutos.

Se toman 300 µl de la solución anterior y se coloca un matraz protegido de la luz con papel aluminio. Se agrega agua destilada hasta completar los 100 ml. Se Obtiene una concentración de 23.428 nmoles de MDA por ml.

Curva patrón

Se empleó como estándar una solución de TMP con una concentración de 23.428 nmoles de MDA por ml. Se realizaron diluciones del estándar como se detalla a continuación:

Tubo	Estándar	Agua destilada	nmoles de MDA
0	1 ml estándar	1 ml	11.714
1	1 ml del tubo 0	1 ml	5.857
2	1 ml del tubo 1	1 ml	2.967
3	1 ml del tubo 2	1 ml	1.463
4	1 ml del tubo 3	1 ml	732
5	1 ml del tubo 4	1 ml	366
6	1 ml del tubo 5	1 ml	183

Determinación

Para realizar las determinaciones de la peroxidación lipídica se utilizaron tubos con tapa a rosca, en cada uno se colocó 600 µl de TCA 15% y 600 µl de TBA 0,375% y 600 µl de los estándares o las muestras por triplicado, según el siguiente esquema:

	Curva Estándar	TCA	TBA	Muestra	Agua destilada	nmoles de MDA
B	-	600 µl	600 µl	-	600 µl	0
1	20 µl tubo1	600 µl	600 µl	-	580 µl	5.857
2	20 µl tubo2	600 µl	600 µl	-	580 µl	2.967
3	20 µl tubo3	600 µl	600 µl	-	580 µl	1.463
4	20 µl tubo4	600 µl	600 µl	-	580 µl	732
5	20 µl tubo5	600 µl	600 µl	-	580 µl	366
6	20 µl tubo6	600 µl	600 µl	-	580 µl	183
n	-	600 µl	600 µl	600 µl	-	¿?

- Se vortereó 10 segundos cada tubo y se colocó en un baño termostatzado a 90°C durante 30 minutos.
- Se enfriaron en freezer a -20°C durante 10 minutos, se colocó 1,8 ml de alcohol isobutilico y se vortereó 10 segundos cada uno de los tubos.
- Luego se centrifugaron 10 minutos todos los tubos a 10.000 rpm, 2°C y se utilizó 1 ml del sobrenadante para realizar las determinaciones.
- Las lecturas de las absorbancias se realizaron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 535 nm. En cubetas de vidrio.

ANEXO IV

PROCOLO DE LECTINHISTOQUÍMICA CON LECTINA BS-I EN PLACENTA

Macros para valorar el porcentaje de marcación con Lectinhistoquímica

```

macro "Lectina" {
dir = getDirectory("Choose a
Directory ");
count = 0;
countFiles(dir);
n = 0;
processFiles(dir);
print(count+" files processed");
function countFiles(dir) {
list = getFileList(dir);
for (i=0; i<list.length; i++) {
if (endsWith(list[i], "/"))
countFiles(""+dir+list[i]);
else
count++;
}
}
function processFiles(dir) {
list = getFileList(dir);
for (i=0; i<list.length; i++) {
if (endsWith(list[i], "/"))
processFiles(""+dir+list[i]);
else {
showProgress(n++, count);
path = dir+list[i];
processFile(path);
}
}
}

```

```

}
}
function processFile(path) {
if (endsWith(path, ".JPG")) {
open(path);
run("Set Scale...", "distance=988
known=15 pixel=1 unit=um");
run("Set Measurements...", "area
area_fraction limit display
redirect=None decimal=3");
run("Colour Deconvolution",
"vectors=[H&E DAB]");
setAutoThreshold("Otsu");
run("Measure");
run("Create Selection");
close();
close();
close();
close();
run("Restore Selection");
run("Draw");
saveAs("Jpeg", "");
run("Close All");
}
}
}
}

```



72677

U.N.R.C
Biblioteca Central



72677