



favet

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN LA EXPRESIÓN
INMUNOHISTOQUÍMICA DEL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA 1 α Y DEL
FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR EN EL OVARIO DE
OVEJAS SOMETIDAS A UN AMBIENTE HIPÓXICO**

LORENA ANDREA BRAVO ARAYA

Memoria de Título para optar al
Título Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas

PROFESOR GUÍA: VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ GAMBOA

Universidad de Chile

SANTIAGO – CHILE

2012

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1100189



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFEECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN LA EXPRESIÓN
INMUNOHISTOQUÍMICA DEL FACTOR INDUCIBLE POR HIPOXIA 1 α Y DEL
FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR EN EL OVARIO DE
OVEJAS SOMETIDAS A UN AMBIENTE HIPÓXICO**

LORENA ANDREA BRAVO ARAYA

Memoria de Título para optar al

Título Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Biológicas

PROFESOR GUÍA	: VÍCTOR PARRAGUEZ G.	NOTA	FIRMA
PROFESOR CORRECTOR	: MARCO GALLEGUILLOS	NOTA	FIRMA
PROFESOR CONSEJERO	: ÓSCAR PERALTA	NOTA	FIRMA

SANTIAGO – CHILE

2012

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1100189

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

En primer lugar quisiera agradecer a Dios por hacer todo esto posible, no tengo dudas que ha influido durante toda mi carrera y en la realización de esta memoria.

Quiero agradecer a mis padres, quienes siempre con su apoyo incondicional me dieron el ánimo y las fuerzas que necesité para continuar y terminar con éxito esta carrera que tanto aprecio.

Agradezco a mi profesor guía, quien con sus correcciones y sugerencias conseguí finalizar este proyecto. También agradezco a mis profesores correctores, quienes con sus sugerencias logré finalizar el escrito.

Agradezco a Constanza Pérez, quien trabajó hombro a hombro conmigo en la realización de esta memoria. Con quien estuve día y noche trabajando con nuestras queridas ovejas. Cota, te agradezco inmensamente por tu apoyo.

Quiero agradecer a mis hermanas Andrea y Lucía, quienes siempre estuvieron dispuestas a escuchar mis historias y a ayudarme cuando lo necesité.

Agradezco a mis amigos, quienes cuando los necesité para ayudarme con la realización de esta memoria, siempre estuvieron disponibles para hacerlo.

Quiero agradecer al amor de mi vida y futuro esposo Esteban, agradezco infinitamente su comprensión y apoyo incondicional durante la finalización de este proyecto, quien con paciencia siempre me escuchó y me brindó las fuerzas necesarias para seguir adelante, a pesar de la distancia que nos separaba.

A mi familia y prometido les dedico esta memoria, sin su apoyo y ánimo jamás lo hubiese logrado.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
Descripción de la temática general.....	1
Visión inicial de la problemática que intenta abordar.....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
Hipoxia, estrés oxidativo y función reproductiva.....	4
Angiogénesis ovárica.....	5
Angiogénesis folicular.....	7
Angiogénesis luteal.....	8
Vitaminas antioxidantes.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Lugar.....	12
Animales.....	12
Manejo de los animales.....	13
Manejo de muestras.....	13
Análisis estadístico.....	14

	Página
RESULTADOS.....	15
Expresión de HIF-1 α	15
Expresión de VEGF.....	17
DISCUSIÓN.....	19
CONCLUSIÓN.....	23
REFERENCIAS.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Expresión de HIF-1 α en folículos ovulatorios de ovejas mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	15
Figura 2. Expresión de HIF-1 α en cuerpos lúteos de ovejas mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	16
Figura 3. Expresión de VEGF en folículos ovulatorios de ovejas mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	17
Figura 4. Expresión de VEGF en cuerpos lúteos de ovejas mediante la técnica de inmunohistoquímica.....	18

RESUMEN

El presente estudio evaluó los efectos de la hipoxia hipobárica y de la suplementación con vitaminas antioxidantes sobre la expresión de HIF-1 α y VEGF, en folículos ovulatorios y cuerpo lúteo durante el ciclo reproductivo no concepcional en ovejas. Para ello se utilizaron 36 ovejas, divididas equitativamente en 6 grupos: grupo originario de altura y mantenidas en altura (HH); grupo originario de altura, mantenidas en altura, con suplementación antioxidante (HHV); grupo originario de nivel del mar y llevados a la altura (LH); grupo originario de nivel del mar, llevados a la altura, con suplementación antioxidante (LHV); grupo originario de nivel del mar y mantenidas a nivel del mar (LL); grupo originario de nivel del mar, mantenidas a nivel del mar, con suplementación antioxidante (LLV). Cada oveja del grupo suplementado con vitaminas antioxidantes recibió una dosis diaria de vitamina C (500 mg) y vitamina E (350 UI). Se extrajeron ovarios con folículo preovulatorio y ovarios con cuerpo lúteo al primer día y quinto día luego de detectarse el tercer celo postsincronización respectivamente. Se realizó la técnica de inmunohistoquímica para detectar la expresión de los factores HIF-1 α y VEGF en cortes de tejido ovárico. Los resultados indicaron que la expresión de HIF-1 α en folículos preovulatorios fue mayor en las ovejas del nivel del mar llevadas a la altura ($P < 0,001$), sin observarse efecto de la suplementación con vitaminas antioxidantes. En cuerpo lúteo, HIF-1 α fue mayor en las ovejas mantenidas en altura ($P < 0,001$) y menor en las ovejas suplementadas con vitaminas antioxidantes ($P < 0,001$). La expresión de VEGF en los folículos preovulatorios fue mayor en las ovejas originarias de altura y originarias del nivel del mar expuestas a la altura ($P < 0,05$). En estos grupos la suplementación con vitaminas antioxidantes disminuyó la expresión de la proteína ($P < 0,05$). La expresión de VEGF en cuerpo lúteo mostró la misma tendencia que en los folículos. Se puede concluir que la hipoxia de altura induce una sobreexpresión de HIF-1 α y VEGF tanto en el folículo preovulatorio como en el cuerpo lúteo. Esto puede ser parte de un mecanismo adaptativo para incrementar la vascularización de estos tejidos y con ello el aporte de oxígeno. Además, las

vitaminas antioxidantes reducen el efecto de la altura sobre la expresión de ambas proteínas, lo que confirma la presencia de estrés oxidativo asociado a la hipoxia hipobárica.

ABSTRACT

The present study evaluated the effects of hypobaric hypoxia and supplementation with antioxidant vitamin on the expression of HIF-1 α and VEGF, in pre-ovulatory follicles and corpus luteum during the non-conceptional reproductive cycle in ewes. For this, 36 ewes were used, divided equally into 6 groups: ewes native to high altitude kept at high altitude (HH); ewes native to high altitude kept at high altitude, supplemented with antioxidant vitamins (HHV); ewes native to low altitude recently arrived and kept at high altitude (LH); ewes native to low altitude recently arrived and kept at high altitude, supplemented with antioxidant vitamins (LHV); ewes native to low altitude kept at low altitude (LL) and ewes native to low altitude kept at low altitude, supplemented with antioxidant vitamins (LLV). In supplemented groups, each animal received a daily oral dose of vitamin C (500 mg) and vitamin E (350 IU) during the entire experimental period. Ovaries with preovulatory follicles and corpus luteum were surgically extracted at the first and fifth day after the third heat post synchronization, respectively. Immunohistochemistry was performed to detect the expression of HIF-1 α and VEGF factors in ovarian tissue sections. The expression of HIF-1 α in preovulatory follicles was higher in ewes native to the sea level recently arrived to altitude ($P<0.001$), however no effect of antioxidant vitamins supplementation was observed. In the corpus luteum, HIF-1 α was higher in ewes kept at altitude ($P<0.001$) and lower in ewes supplemented with antioxidant vitamins ($P<0.001$). The expression of VEGF in the preovulatory follicles was higher in ewes native to high altitude and in the ewes native to low altitude recently exposed to altitude ($P<0.05$). In these same groups, the supplementation with antioxidants vitamins decreased VEGF expression ($P<0.05$). In the corpus luteum, the expression of VEGF showed the same trend that in the follicles. In conclusion, high altitude hypoxia induces an overexpression of HIF-1 α and VEGF in the pre-ovulatory follicle and in the corpus luteum. This may be part of an adaptive mechanism to increase the vascularization of these tissues and thereby the oxygen supply. Moreover, the

antioxidants vitamins reduce the effect of altitude on the expression of both peptides, confirming the presence of oxidative stress associated to hypobaric hypoxia.

INTRODUCCIÓN

Descripción de la temática general

Una de las funciones biológicas más sensibles a los cambios del ambiente es la reproducción. Sin embargo, la capacidad de adaptación en humanos y algunos animales ha permitido la ocupación de ambientes con características complejas para la vida, como la altura. Aún así, la hipoxia hipobárica es un factor ambiental inevitable para las poblaciones de humanos y animales que habitan zonas de gran altura, la que repercute de manera importante en la reproducción, reduciendo la fertilidad.

El conocimiento de la reproducción ovina en un ambiente hipóxico en altura toma importancia debido a que esta especie fue introducida a estas zonas en América por colonos europeos alrededor de 500 años atrás. Sin embargo, a pesar del tiempo de esta especie bajo condiciones de altura, la eficiencia reproductiva ovina sigue siendo baja. Esta especie tiene gran importancia a nivel social y económico para los ganaderos que habitan en la altura, ya que hay cerca de 25 millones de personas habitando en altitudes por encima de los 2500 m en países en desarrollo y en vías de desarrollo que se benefician de la crianza ovina (Huddleston *et al.*, 2003). En los territorios de altura en Chile, especialmente en la Región de Arica-Parinacota (XV Región), habitan alrededor de 10.000 campesinos aymaras en zonas rurales (Censo 2002) que se dedican a la ganadería camélida y ovina, por lo que el potencial reproductivo de los animales de interés económico es de vital importancia.

Visión inicial de la problemática que intenta abordar

La baja fertilidad en zonas de altura se puede atribuir a los efectos de la hipoxia y/o del estrés oxidativo inducido por hipoxia. Esto podría incrementar la expresión del Factor Inducido por Hipoxia 1α (HIF- 1α) y del Factor de Crecimiento Vascular

Endotelial (VEGF), para mejorar el aporte de oxígeno en los tejidos involucrados en la función reproductiva. Información preliminar indica que la administración de vitaminas antioxidantes como la vitamina C y E mejorarían la fecundidad en ovejas mantenidas en altura (Parraguez *et al.*, 2006a). Por lo tanto, parece interesante establecer los efectos de la terapia antioxidante sobre HIF-1 α y VEGF, debido al rol de estas moléculas en la respuesta a la hipoxia y el estrés oxidativo en ovejas criadas en altura.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El principal estrés ambiental que se produce en altura se debe a la hipoxia hipobárica, que produce hipoxia fisiológica (menor cantidad de oxígeno que la normal presente en el organismo). La severidad de la hipoxia hipobárica va aumentando con la altura debido a la caída en la presión parcial de oxígeno atmosférico (Beall, 2007).

En América se han encontrado evidencias de vida humana sobre los 4000 m de altura con antigüedad de 10.000 años en Perú. Probablemente este período haya sido suficiente para lograr una adaptación por medio de la selección natural al nivel de hipoxia existente en la zona (González, 2007). Se describe que sobre los 4000 m de altura, el aire contiene solamente alrededor del 60% del oxígeno del nivel del mar. Consecuentemente, menor cantidad de oxígeno por inspiración de aire resulta en menos difusión de oxígeno hacia el torrente sanguíneo y a las células (Beall, 2007).

Estudios iniciales sobre el efecto de la altura en reproducción se realizaron en ovejas, cabras, gatos y conejos. Estos demostraron que la exposición aguda a grandes alturas resulta en una infertilidad transitoria (González, 2007). En ovejas, existe escasa información acerca de la reproducción en rebaños en altura y su fertilidad en tal condición ha sido pobremente estudiada. La reproducción de la especie ovina se caracteriza por ser poliéstrica estacional con una mayor actividad en el período otoño-invernal, estimulada por el acortamiento del período diario de luz solar. El ciclo sexual dura en promedio 17 días, con un proestro de dos a tres días, un estro de aproximadamente 36 horas, un metaestro de dos a tres días y un diestro de 12-13 días. La ovulación se produce al final del celo, aproximadamente a las 24 horas de comenzado éste (Palacios y Blanco, 2000).

Los estudios realizados en ovejas mantenidas en altura han concluido que la hipoxia hipobárica tiene efectos significativos sobre las características del proceso

reproductivo ovino. Se ha descrito en ovejas preñadas sometidas a un ambiente hipóxico, que el crecimiento intrauterino y peso del cordero al nacer disminuye, independiente del tiempo de permanencia de la oveja en altura (Parraguez *et al.*, 2005). También se ha demostrado que la hipoxia provocada por la altura impacta sobre la placenta ovina, tanto en las características macroscópicas como microscópicas. Se describió que hembras que han pasado un largo período en zonas de altura han disminuido el número de placentomas e incrementado el diámetro de este, lo que aumenta la superficie de contacto cotiledón-carúncula y del área del cotiledón ocupada por lumen vascular. Estas modificaciones observadas podrían mejorar el intercambio materno-fetal, evitando de esta forma, al menos parcialmente, los efectos de la baja tensión de oxígeno en las zonas de altura (Parraguez *et al.*, 2006b).

Hipoxia, estrés oxidativo y función reproductiva

La exposición a la altura reduce la presión de oxígeno a nivel tisular y altera el equilibrio redox (Dosek *et al.*, 2007). A nivel celular, la hipoxia produce un incremento en la producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno (ERO), lo que puede llevar a un estado de estrés oxidativo (Pialoux *et al.*, 2008). Los tres principales tipos de ERO son el radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Agarwal *et al.*, 2005). Las ERO son continuamente generados en las diferentes vías metabólicas, son capaces de interactuar con diferentes biomoléculas y provocar daño celular. No obstante, los organismos poseen un poderoso sistema antioxidante que protege de los efectos nocivos de los radicales libres (Chihuailaf *et al.*, 2002).

En estricto rigor, un radical libre se define como cualquier especie química de existencia independiente que posee uno o más electrones desapareados girando en sus orbitales atómicos externos. Esta característica le confiere la propiedad de ser una especie química altamente reactiva y de corta vida. Desde el punto de vista químico, un radical libre puede originarse por distintos mecanismos, pero el más

frecuente en los organismos vivos es mediante la adición de un electrón a una molécula estable (Chihuilaf *et al.*, 2002).

La producción excesiva de ERO y radicales libres *in vivo* tiene una variedad de efectos dañinos, los cuales incluyen peroxidación lípida de las membranas, oxidación de las proteínas y degradación del DNA (Pialoux *et al.*, 2008). Las ERO, pueden afectar a múltiples procesos fisiológicos desde la maduración de los ovocitos, la fecundación el desarrollo del embrión y la gestación (Córdova *et al.*, 2010). En mujeres, la condición de estrés oxidativo es capaz de repercutir en la fertilidad y gestación, generando complicaciones como aborto, preeclampsia, ruptura de membranas y partos prematuros (Gutierrez, 2005). Además, se ha descrito que las células de la granulosa y luteales responden al radical peróxido de hidrógeno con la supresión de la acción gonadotrópica e inhibición de la secreción de progesterona. La producción de progesterona y estradiol es reducida cuando se añade peróxido de hidrógeno a un cultivo de células luteales estimuladas con gonadotropina coriónica humana (Agarwal *et al.*, 2005).

Angiogénesis Ovárica

La regulación de los niveles de oxígeno en la célula ha sido implicada como un crucial aspecto de la fisiología ovárica (Kai, 2009). La función ovárica es dependiente del establecimiento y continuo remodelamiento de un complejo sistema vascular. Esto permite que tanto el folículo y cuerpo lúteo reciban el suministro requerido de nutrientes, oxígeno y soporte hormonal, así como facilitar la liberación de esteroides. Por otra parte, la inhibición de la angiogénesis resulta en la atenuación del crecimiento folicular, alteración de la ovulación y efectos negativos en el desarrollo y función del cuerpo lúteo (Robinson *et al.*, 2009).

La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos desde otros preexistentes y envuelve una serie compleja de procesos celulares y cambios moleculares. El ovario se somete a cambios cíclicos y por ello requiere angiogénesis

continua. Los vasos permanecen en reposo hasta que un estímulo angiogénico como la hipoxia regula factores proangiogénicos como el VEGF (Robinson *et al.*, 2009). El VEGF es considerado como el mayor regulador en la producción de nuevos vasos sanguíneos en el ovario de los mamíferos, siendo un potente factor mitogénico de las células endoteliales. También juega un papel en la mantención estructural e incrementa la permeabilidad de capilares (Al-zi'abi *et al.*, 2003; Tamanini y De Ambrogi, 2004; Rosales-Torres *et al.*, 2010). Su expresión es diferencial de acuerdo al tamaño y estado funcional del folículo y se ha identificado en células de la granulosa y teca de folículos en diferentes estadios de desarrollo, especialmente durante la dominancia, mientras que en folículos atrésicos su expresión disminuye (Julio, 2006). La producción del VEGF incrementa la luteinización de las células de la granulosa del folículo ovulatorio. La inhibición del VEGF tiene un profundo efecto inhibitorio en la función luteal (Fraser y Wulff, 2003).

El VEGF en la oveja es un proteína de 164 aminoácidos (Rivas *et al.*, 2006). En los folículos preovulatorios del ovino, la expresión del VEGF es solamente detectable en la teca interna. También es detectable en áreas derivadas de la teca en el cuerpo lúteo (Tamanini y De Ambrogi, 2004; Rosales-Torres *et al.*, 2010). El control de la expresión del gen del VEGF ocurre antes y después de su transcripción. Los cambios en la tensión de oxígeno son el mecanismo esencial en la regulación transcripcional del VEGF, a través de la inducción del HIF-1 (Álvarez-Arroyo *et al.*, 2003).

HIF-1 es un heterodímero compuesto de dos subunidades, HIF-1 α y HIF-1 β . La subunidad HIF-1 β es constitutivamente expresada (Caramelo *et al.*, 2006). La actividad del complejo HIF es principalmente mediada por la estabilidad de la proteína de la subunidad α . En condiciones de normoxia, la subunidad α es constitutivamente expresada, pero rápidamente degradada. Ante el cambio a un ambiente bajo en oxígeno, la subunidad α se estabiliza y se trasloca al núcleo. A concentraciones normales de oxígeno la subunidad α del complejo HIF es hidroxilada en dos residuos de prolina altamente conservados. La proteína HIF-1 α hidroxilada se une a la proteína VHL (von Hippel-Lindau), esta es necesaria para

unir la ubiquitina y así, el complejo ubiquitina-HIF1 α es reconocido por el proteosoma y degradado. Con este mecanismo se impide la acumulación citoplasmática de la proteína HIF-1 α y su traslocación al núcleo; por lo tanto, impide la activación de genes que contienen la secuencia de respuesta a hipoxia (Wagner, 2011; Aquino y González, 2010). En normoxia HIF-1 α no se detecta y su tiempo de vida media es de 5 minutos, pero en hipoxia su vida media aumenta considerablemente hasta 30 minutos (Marín-Hernández, 2009; Li *et al.*, 2009).

El incremento en la expresión de VEGF en condiciones de hipoxia ocurre a través de mecanismos moleculares de aumento de transcripción y/o estabilización de su mRNA. La regulación transcripcional del VEGF en condiciones de hipoxia está mediada por la unión de HIF-1 a secuencias específicas localizadas en el promotor del VEGF (Caramelo *et al.*, 2006).

Ya que la mitocondria es el mayor organelo consumidor de oxígeno, se puede esperar que juegue una función central en el proceso sensible al oxígeno mediante la variación de la producción de las ERO durante la hipoxia (Basini *et al.*, 2004). Las ERO también parecen jugar un rol en el proceso de señalización que controla a HIF-1 α . Sin embargo, aunque las ERO han sido reconocidos como un sensor del oxígeno en la estabilización de HIF-1 α bajo condiciones de hipoxia en experimentos *in vitro*, la cinética de la producción de ERO y su importancia hacia la proteína HIF-1 α no han sido completamente dilucidadas (Pialoux *et al.*, 2008).

- **Angiogénesis Folicular**

Mientras se desarrolla el folículo bajo condiciones normales, la difusión del oxígeno hacia el ovocito es dificultada por las células de la granulosa y la zona pelúcida a medida que estas proliferan. Por ello el consumo de oxígeno demandado por el ovocito es obstaculizado en la ovulación, debido al aumento del grosor de las capas celulares que lo rodean. El VEGF es controlado por regulación endocrina, paracrina y autocrina, por factores de crecimiento, citoquinas y una variedad de influencias ambientales como la hipoxia (Kai, 2009).

La estructura del folículo consiste en un ovocito rodeado por una zona pelúcida y una capa de células granulosas. Luego en el folículo en desarrollo, las células se desarrollan en dos capas; la capa de la teca, que tiene su propio suministro vascular y, la capa granulosa, que es avascular (Tamanini y De Ambrogi, 2004). Los folículos primordiales que no crecen y los folículos preantrales de crecimiento lento no presentan suministro vascular por sí mismos, pero se apoyan en los vasos del estroma circundante (Tamanini y De Ambrogi, 2004). Sin embargo, durante el desarrollo del anro en el folículo, la teca adquiere dos redes capilares localizadas en la teca interna y externa, respectivamente (Tamanini y De Ambrogi, 2004). Durante el desarrollo folicular, una gradiente de oxígeno que disminuye hacia el ovocito puede limitar la capacidad de la fosforilación oxidativa de los ovocitos, como también la proliferación de células de la granulosa (Kai, 2009). La adquisición de un adecuado suministro vascular es posiblemente un paso limitante en la selección y maduración del folículo destinado a ovular (Tamanini y De Ambrogi, 2004).

- **Angiogénesis Luteal**

Estudios en rumiantes han mostrado que el cuerpo lúteo es uno de los tejidos más altamente vascularizados en el organismo (Al-zi'abi *et al.*, 2003). Una característica importante durante el desarrollo del cuerpo lúteo es su gran demanda metabólica debido a la elevada tasa de crecimiento (Rosales y Guzmán, 2008).

En ovejas, el folículo ovulado que pesa alrededor de 40 mg tiene que desarrollarse hasta un cuerpo lúteo maduro de entre 600 y 700 mg en 3 ó 4 días. Esta elevada tasa metabólica implica un gran desarrollo de vasos sanguíneos para satisfacer las necesidades de oxígeno y nutrientes de esta glándula. Para ello el VEGF y sus receptores, juegan un papel fundamental en la formación de vasos sanguíneos durante el desarrollo del cuerpo lúteo que le permite cubrir estas demandas (Rosales y Guzmán, 2008).

El estudio de Nishimura y Okuda (2010) indicó que el cuerpo lúteo temprano se desarrolla bajo condiciones de hipoxia y sugieren que HIF1, activado bajo estas

condiciones, contribuye al establecimiento del cuerpo lúteo induciendo la angiogénesis vía VEGF en bovinos.

Estudios cuantitativos en el cuerpo lúteo ovino han revelado que en la etapa luteal temprana, las células endoteliales constituyen aproximadamente el 85% de las células en proliferación y representa más del 50% de las células presentes en el cuerpo lúteo maduro (Al-zi'abi *et al.*, 2003).

Después de la ovulación, la membrana basal entre las capas de la granulosa y la teca, se somete a una disolución y los capilares tecales se expanden por brotes en la granulosa avascular para formar una densa red de capilares sinusoidales que rodean las células de la granulosa luteinizadas (Tamanini y De Ambrogi, 2004).

Estudios realizados en bovinos demuestran que la hipoxia no afecta la producción de progesterona en células luteales de etapas tempranas en la formación del cuerpo lúteo, mientras que sí disminuyó en células luteales de etapas medias (Nishimura y Okuda, 2010). Estos hallazgos indican que la respuesta de las células a la hipoxia cambia desde etapas tempranas a medias y se sugiere que células de etapas tempranas son más resistentes a la disminución de progesterona inducida por la hipoxia que las células luteales de etapas medias (Nishimura y Okuda, 2010).

La regresión luteal incluye la degeneración de los vasos y células esteroideogénicas. Sin embargo, las células endoteliales de los microvasos son las primeras en experimentar apoptosis en el inicio de la regresión del cuerpo lúteo. La regresión estructural del cuerpo lúteo comienza con la pérdida de las uniones estrechas de las células endoteliales y la ruptura de la barrera permeable de la pared vascular. Como resultado, las células endoteliales capilares se desprenden de la membrana basal y ocluyen los vasos sanguíneos pequeños. Los capilares desaparecen, mientras las arteriolas con pared engrosada aparecen, aparentemente como resultado de un incremento de las células musculares lisas. Se puede detectar la regresión del cuerpo lúteo ovino desde los días 12-15 de la fase luteal, ya que en esos días se ha observado una reducción de su contenido de ADN (Tamanini y De Ambrogi, 2004).

Vitaminas Antioxidantes

Los gametos están equipados con sistemas antioxidantes naturales para contrarrestar los efectos tóxicos de las ERO, por lo que la función de un antioxidante es actuar como un donador de electrones, capaz de evitar una reacción de óxido-reducción en cadena. Los antioxidantes son moléculas que previenen la formación descontrolada de radicales libres o inhiben sus reacciones (Córdova *et al.*, 2010). Bajo condiciones normales, los antioxidantes endógenos convierten las ERO en agua, para prevenir el estrés oxidativo. Existen dos tipos de antioxidantes, los enzimáticos y los no enzimáticos. Entre los antioxidantes no enzimáticos, los más conocidos son la vitamina C y E (Agarwal *et al.*, 2005). La suplementación de vitaminas C y E durante la gestación ovina en altura previene el estrés oxidativo inducido por la hipoxia, e incrementa el peso de corderos recién nacidos (Parraguez *et al.*, 2011). Además, el consumo de una dieta rica en vitaminas C y E en mujeres con endometriosis mostró una disminución en los marcadores de estrés oxidativo en sangre periférica después de cuatro meses de intervención (Mier *et al.*, 2008). Un estudio realizado en 97 hombres sanos no fumadores de entre 20 y 80 años que ingirieron una dieta alta en vitaminas antioxidantes C y E evidenció un mejoramiento en la calidad del semen, en comparación con los hombres que ingirieron una baja o moderada cantidad de antioxidantes, lo que demuestra una correlación entre el incremento de la ingesta diaria de antioxidantes y el mejoramiento de parámetros seminales (Silver *et al.*, 2005).

La vitamina C es un antioxidante hidrofílico encontrado principalmente en plantas. Se encuentra bajo la forma de ascorbato, distribuido intra y extracelularmente. Intracelularmente, la vitamina C podría actuar como un antioxidante para regular la expresión de genes, regular la traducción de mRNA o prevenir el daño oxidativo de las proteínas intracelulares (Chihuilaf *et al.*, 2002). Extracelularmente también podría tener un rol protector contra el daño oxidativo y mediadores de la oxidación. Reacciona en forma directa con los radicales libres superóxido, hidroxilo y varios hidroperóxidos lipídicos. También actúa sobre el radical libre tocoferoxilo (forma

oxidada) regenerando la vitamina E hacia su forma reducida (Padayatty *et al.*, 2002). La absorción de la vitamina C se lleva a cabo en el yeyuno, mediante un proceso saturable según la dosis, lo que traduce que a mayor ingestión, la absorción proporcional disminuye (Córdova *et al.*, 2010).

La vitamina E es el antioxidante lipofílico más efectivo en la naturaleza, protegiendo los ácidos grasos insaturados en las membranas celulares del ataque de los radicales libres (Chihuilaf *et al.*, 2002). La vitamina E se compone de ocho isómeros estructurales de tocoferol. La captura de radicales libres superóxido, hidroxilo y peroxilos lipídicos la desarrolla en membranas celulares y subcelulares como la mitocondria y retículo endoplásmico liso. Para estabilizar un radical libre, el tocoferol se convierte en el radical libre tocoferoxilo. Sin embargo, el tocoferoxilo retorna a su estado original a través de reacciones mediadas por la coenzima Q y en menor grado por las vitaminas C y A (Landvik *et al.*, 2002). La absorción de la vitamina E dietaria, ocurre vía los quilomicrones en el yeyuno y posteriormente pasa a la vía del sistema linfático. Los tocoferoles son transportados como parte del complejo de las lipoproteínas. Su absorción requiere de sales biliares y jugos pancreáticos cuya secreción es estimulada por la grasa dietaria (Córdova *et al.*, 2010).

El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de la suplementación de vitaminas antioxidantes en la expresión inmunohistoquímica del HIF-1 α y del VEGF en folículos ováricos y cuerpo lúteo de ovejas sometidas a un ambiente hipóxico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar

El estudio se realizó en el Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS) de la Universidad de Chile en la localidad de Putre, Región de Arica y Parinacota, ubicado a 3600 msnm y en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, en Santiago, a 540 msnm.

Animales

Los animales considerados en este estudio corresponden a ovejas criollas nacidas a una altura sobre 3500 m, originadas a partir de los rebaños de ovejas que viven a gran altitud por varias generaciones y ovejas criollas nacidas en altitudes menores a los 600 m, cuyos padres pertenecen a rebaños nativos de baja altitud. A partir de este tipo de ovejas, se formaron seis grupos, de seis animales cada uno: ovejas nativas de altura mantenidas en altura (HH), ovejas nativas de altura mantenidas en altura con tratamiento antioxidante (HHV), ovejas nativas de baja altitud llevadas a la altura (LH), ovejas nativas de baja altitud llevadas a la altura con tratamiento antioxidante (LHV), ovejas nativas de baja altitud mantenidas a baja altura (LL) y ovejas nativas de baja altitud mantenidas en baja altura con tratamiento antioxidante (LLV).

Los animales se alimentaron con 2 kg de heno de alfalfa por día, suministrado en dos raciones (mañana y tarde). Los grupos HHV, LHV y LLV recibieron junto con una pequeña fracción de la primera ración de alfalfa, 500 mg de vitamina C (Quimagro S.A., Chile) y 350 UI de vitamina E (Quimagro S.A., Chile), desde una semana antes de la sincronización de celos y hasta el final del estudio. Todos los grupos contaron con disponibilidad de agua ad libitum. En cada localidad, las ovejas se mantuvieron en dos corrales, uno para las suplementadas y otro para las no suplementadas con vitaminas.

Manejo de los animales

La actividad reproductiva se sincronizó en las hembras con dos dosis separada por siete días, de un análogo sintético de prostaglandina F_{2α} (Cloprostenol 125 µg, IM). Se utilizaron dos machos criollos vasectomizados en cada lugar, que se alternaron diariamente entre las ovejas sin tratamiento antioxidante y las ovejas con tratamiento antioxidante.

Después de la segunda administración de Cloprostenol, los machos fueron pintados en el área del pecho con una mezcla de tierra de color y aceite vegetal e introducidos a cada grupo de ovejas respectivamente. Esto permitió detectar a las hembras que presentan celo por la aparición de la marca de color en su grupa. Los machos se alternaron diariamente entre corrales. Además, se realizó un seguimiento de la actividad ovárica mediante ecografías transrectales cada dos días en cada oveja con un transductor de 7MHz.

El día 1 del tercer celo, se realizó una ovariectomía del ovario con el folículo dominante en 3 animales de cada grupo, usando la técnica de laparoscopia bajo ketamina (20 mg/kg) como anestésico. Después de cinco días desde el tercer celo, los otros 3 animales de cada grupo fueron anestesiados para realizar la ovariectomía del ovario que presentó el cuerpo lúteo mediante laparoscopia

Manejo de muestras

Los ovarios que contenían tanto los folículos dominantes como cuerpo lúteo se fijaron en una solución de paraformaldehído 4% en amortiguador fosfato, pH 7.4, para después ser incluidos en parafina, mediante técnica estándar para procedimientos histológicos. Luego se obtuvieron cortes de tejido de 6 µm de grosor. Alternadamente, se utilizaron cortes para tinción con hematoxilina-eosina (H-E) y para inmunohistoquímica para detección de HIF-1α y VEGF.

Para la detección inmunohistoquímica de HIF-1 α , se usó el anticuerpo policlonal de conejo anti-HIF-1 α (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, USA), siguiendo la técnica descrita por Daponte *et al.* (2008), como segundo anticuerpo se usó el anticuerpo IgG-B desarrollado en cabra anticonejo (sc-2040, Santa Cruz, California, USA). Para la detección inmunohistoquímica de VEGF se utilizó el anticuerpo policlonal anti-VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA., USA), como segundo anticuerpo se usó el anticuerpo IgG-B desarrollado en cabra anticonejo (sc-2040, Santa Cruz, California, USA) siguiendo los procedimientos descritos en placenta ovina por Parraguez *et al.* (2010). El control de la reacción inmunohistoquímica para ambas proteínas se realizó incubando la muestra sin el primer anticuerpo. Se obtuvieron tres cortes por cada ovario, de los que se analizaron cinco campos ópticos por corte. La tinción para cada proteína específica fue evaluada mediante un microscopio de luz con magnificaciones de 100-400x. Las imágenes digitales fueron capturadas y almacenadas en un computador, para luego analizar la densidad de la tinción mediante el software ImageJ (NIH, USA, free software), usando la metodología descrita por Girish y Vijayalakshmi (2004).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados por medio de análisis de varianza, siguiendo el modelo factorial incompleto, donde los factores de variación fueron el origen de la oveja (altura o nivel del mar), lugar donde se desarrolló su actividad reproductiva (altura o nivel del mar) y suplementación con vitaminas (sin o con). Cuando el ANOVA resultó significativo se realizó el test post-hoc de Duncan para establecer cuáles son los grupos diferentes. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$. El análisis se realizó por medio del software SPSS15.0 (IBM Corporation).

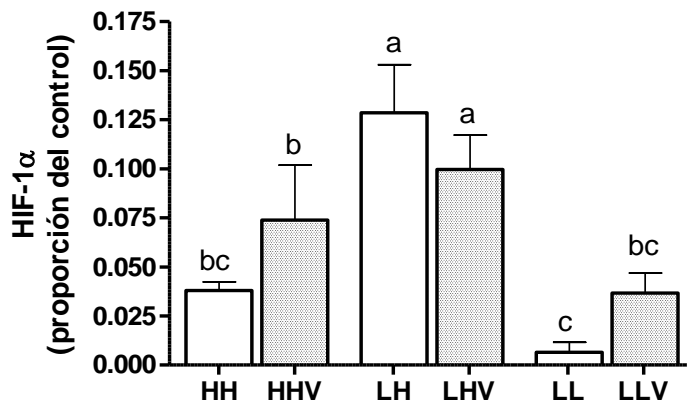
RESULTADOS

Expresión del HIF-1 α

Los resultados obtenidos mediante la técnica de inmunohistoquímica para HIF-1 α en folículos (Fig. 1) reflejaron efectos significativos entre los orígenes de cada grupo y la altura donde ciclaron ($P < 0,001$ en ambos casos). Se mostraron diferencias significativas en la interacción entre la altura donde ciclaron las ovejas y la suplementación con vitaminas antioxidantes ($P = 0,016$).

Fig. 1

Expresión de HIF-1 α en folículos ovulatorios de ovejas mediante la técnica de inmunohistoquímica



Letras distintas indican diferencia significativa entre los grupos; $p < 0,05$.

LL: Grupo de animales originario de nivel de mar, ciclo a nivel del mar;

LLV: Grupo de animales originario de nivel de mar, ciclo a nivel del mar, suplementado con vitaminas;

LH: Grupo de animales originario de nivel de mar, ciclo de altura;

LHV: Grupo de animales originario de nivel del mar, ciclo de altura, suplementado con vitaminas;

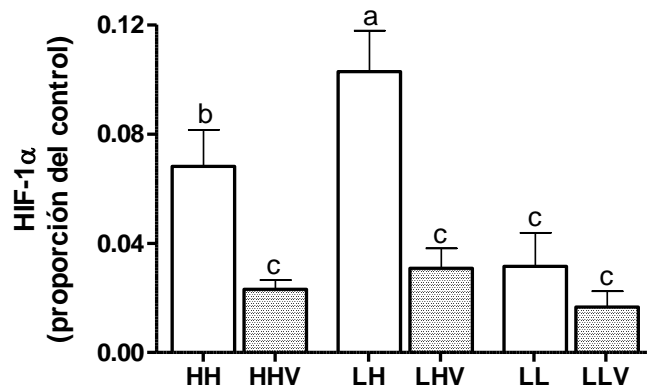
HH: Grupo de animales originario de altura, ciclo de altura;

HHV: Grupo de animales originario de altura, ciclo de altura, suplementado con vitaminas.

La inmunohistoquímica de HIF-1 α en cuerpos lúteos (Fig. 2) evidenció efectos significativos en la altura donde ciclan ($P<0,001$) y en la suplementación de vitaminas antioxidantes ($P<0,001$). También se reveló interacción entre la altura donde ciclan las hembras y la suplementación antioxidante ($P=0,014$).

Fig. 2

Expresión de HIF-1 α en cuerpos lúteos de ovejas mediante la técnica de inmunohistoquímica



Letras distintas indican diferencia significativa entre los grupos; $p<0,05$.

LL: Grupo de animales originario de nivel de mar, ciclo a nivel del mar;

LLV: Grupo de animales originario de nivel de mar, ciclo a nivel del mar, suplementado con vitaminas;

LH: Grupo de animales originario de nivel de mar, ciclo de altura;

LHV: Grupo de animales originario de nivel del mar, ciclo de altura, suplementado con vitaminas;

HH: Grupo de animales originario de altura, ciclo de altura;

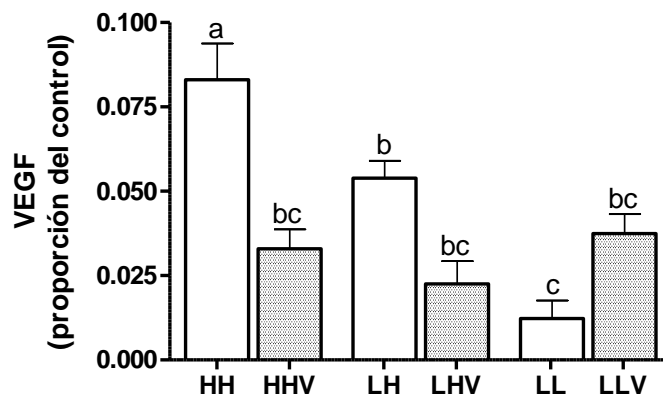
HHV: Grupo de animales originario de altura, ciclo de altura, suplementado con vitaminas.

Expresión de VEGF

Los resultados obtenidos mediante la técnica de inmunohistoquímica para VEGF en folículos (Fig. 3) evidenció efectos significativos en la altura donde ciclaron las hembras, la suplementación de vitaminas antioxidantes y el origen de los animales ($P=0,003$, $0,016$ y $0,049$, respectivamente). También hubo interacción entre altura donde ciclan y la suplementación de antioxidantes ($P=0,005$).

Fig. 3

Expresión de VEGF en folículos ovulatorios de ovejas mediante la técnica de inmunohistoquímica



Letras distintas indican diferencia significativa entre los grupos; $p < 0,05$.

LL: Grupo de animales originario de nivel de mar, ciclo a nivel del mar;

LLV: Grupo de animales originario de nivel de mar, ciclo a nivel del mar, suplementado con vitaminas;

LH: Grupo de animales originario de nivel de mar, ciclo de altura;

LHV: Grupo de animales originario de nivel del mar, ciclo de altura, suplementado con vitaminas;

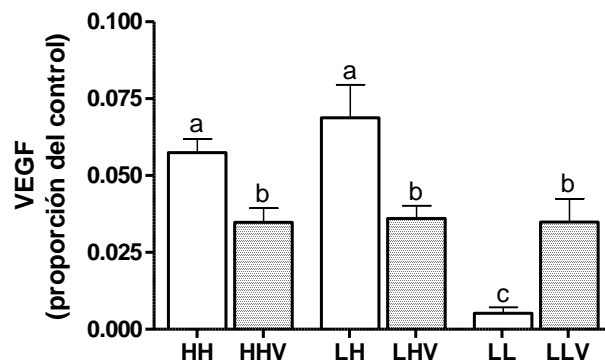
HH: Grupo de animales originario de altura, ciclo de altura;

HHV: Grupo de animales originario de altura, ciclo de altura, suplementado con vitaminas.

En el caso de la expresión del VEGF en los cuerpos lúteos ovinos (Fig. 4) solo fue significativo el efecto de la altura donde ciclan ($P < 0,001$). También hubo interacción entre el lugar donde ciclan y la suplementación de vitaminas ($P < 0,001$).

Fig. 4

Expresión de VEGF en cuerpos lúteos ovinos mediante la técnica de inmunohistoquímica



Letras distintas indican diferencia significativa entre los grupos; $p < 0,05$.

LL: Grupo de animales originario de nivel de mar, ciclo a nivel del mar;

LLV: Grupo de animales originario de nivel de mar, ciclo a nivel del mar, suplementado con vitaminas;

LH: Grupo de animales originario de nivel de mar, ciclo de altura;

LHV: Grupo de animales originario de nivel del mar, ciclo de altura, suplementado con vitaminas;

HH: Grupo de animales originario de altura, ciclo de altura;

HHV: Grupo de animales originario de altura, ciclo de altura, suplementado con vitaminas.

DISCUSIÓN

El presente estudio demostró en general un efecto de los antioxidantes sobre la prevención de los efectos del estrés oxidativo inducido por hipoxia en la expresión de las proteínas HIF-1 α en y VEGF en el ovario ovino.

La expresión de HIF-1 α en folículos y cuerpos lúteos de ovejas sometidas a un ambiente de hipoxia hipobárica fue mayor que en el caso de ovejas mantenidas en un ambiente de normoxia. No se encontraron trabajos similares en la literatura. Sin embargo, en varios estudios en otros tejidos se describió el efecto de la hipoxia sobre la expresión de HIF-1 α . En ratas, se observó un incremento de la expresión de esta proteína en los cuerpos carotídeos bajo hipoxia crónica en comparación con ratas en normoxia (Di Giulio et al, 2005). Este mismo resultado se observó en otro estudio realizado en ratones donde se concluyó que la expresión de HIF-1 α en el cerebro, riñón e hígado aumenta en hipoxia (Stroka et al., 2001).

Nuestro estudio también evidenció diferencias significativas en la expresión de HIF-1 α en los dos grupos sometidos a un ambiente hipóxico (LH y HH), donde LH mostró una expresión mayor que el grupo HH. Esto indica que las ovejas originarias del nivel del mar responden más negativamente al estímulo hipóxico, a diferencia de las ovejas que ya se encontraban adaptadas por generaciones a este ambiente.

La expresión de VEGF en condiciones de hipoxia fue mayor que en un ambiente de normoxia. No se encontraron trabajos en células ováricas sanas. Sin embargo, estudios hechos en células cancerígenas de ovario demostraron que la hipoxia incrementa la expresión de VEGF a través de la regulación de HIF-1 α (Horiuchi et al., 2002). Este mismo resultado se observó en tejido placentario ovino, donde se mostró que la expresión de VEGF es significativamente mayor en hipoxia que en normoxia (Parraguez et al., 2010). Estudios realizados en pulmones de ratas sometidos a hipoxia aguda y crónica también demostraron que la expresión de VEGF se incrementa en comparación con los individuos bajo un ambiente de

normoxia (Tuder *et al.*, 1995). Sin embargo, experimentos realizados en humanos demostraron que bajo condiciones de hipoxia, la concentración de VEGF plasmática en humanos sanos es menor que en individuos bajo condiciones de normoxia (Oltmanns *et al.*, 2005). La misma tendencia se observó en el tejido placentario de mujeres que vivían en condiciones de hipoxia hipobárica, donde se pudo observar que la peroxidación lipídica, como indicativo de estrés oxidativo, fue significativamente mayor en las mujeres de ambientes hipóxicos que en mujeres de ambientes normóxicos (Zamudio *et al.*, 2007). Otro estudio realizado en los vasos sanguíneos que perfunden el músculo gastrocnemio de ratas concluyó que la exposición prolongada a la hipoxia disminuye la expresión de VEGF en los vasos sanguíneos de este músculo (Olfert *et al.*, 2001). Por lo tanto, cómo es que la hipoxia afecta la expresión de VEGF sigue siendo un tema controversial.

Los resultados de la expresión de VEGF en folículos ovulatorios de ovejas sometidas a hipoxia fueron contradictorios, ya que se esperaba según los resultados de HIF-1 α (Horiuchi *et al.*, 2002), que la expresión de VEGF de ovejas sometidas a hipoxia hipobárica fuese mayor en el grupo LH como respuesta a la condición aguda de la hipoxia. Sin embargo, fue el grupo HH el que manifestó la mayor expresión de VEGF de manera significativa. Además, al observarse que generaciones originarias de zonas de altura logran una adaptación al ambiente bajo condiciones de hipoxia hipobárica (Gonzalez, 2007), se esperaba que LH mostrara una mayor expresión de VEGF en folículos que HH como respuesta de tipo aguda a la hipoxia hipobárica (Moreno *et al.*, 2003), lo que se observó como tendencia en los resultados de la expresión de VEGF en cuerpo lúteo. Este resultado de la expresión de VEGF en cuerpo lúteo también concuerda con un estudio realizado en tejido placentario ovino, donde se observó, al igual que en este trabajo que la expresión de esta proteína en el grupo LH fue mayor que en el grupo HH (Parraguez *et al.*, 2010).

Los resultados de este estudio en relación con la suplementación con vitaminas antioxidantes revelan que en general, estas disminuyen la expresión tanto de HIF-1 α como de VEGF en los grupos mantenidos en la altura. Sin embargo, hubo diferencias en la respuesta a esta suplementación, que se traducen en que los

folículos presentan respuestas de menor magnitud, lo que lleva a que en algunos casos la respuesta no logra significancia estadística. Esto podría deberse a una menor llegada de antioxidantes al territorio folicular en comparación con el luteal, o bien, a que los folículos están naturalmente mejor protegidos del estrés oxidativo que los cuerpos lúteos.

Estudios realizados para evaluar las vitaminas antioxidantes sobre los efectos del estrés oxidativo han demostrado que estos efectos se reducen. Por ejemplo, estudios realizados en ovejas para evaluar el efecto del tratamiento con vitaminas antioxidantes sobre características placentarias y de recién nacidos en hembras gestantes en altura, demostraron el efecto preventivo de la suplementación vitamínica sobre el estrés oxidativo (Parraguez *et al.*, 2011). Se ha visto también que la suplementación vitamínica en mujeres embarazadas puede prevenir la ruptura prematura de membranas, la que se asocia con el estrés oxidativo. Se observó que en pacientes con concentraciones plasmáticas de vitamina C menores de 10 $\mu\text{mol/L}$, es mucho mayor la frecuencia de aparición de la ruptura prematura de membranas espontánea que cuando la concentración de esta vitamina son mayores de 30 $\mu\text{mol/L}$ (Siega-Riz *et al.*, 2003). Además, estudios *in vitro* sugieren que la vitamina E juega un papel sinérgico con la vitamina C al incrementar su capacidad antioxidante contra las ERO, por lo que se concluyó que la suplementación con ambas vitaminas podría ofrecer prevención contra la ruptura prematura de membranas inducida por ERO (Woods *et al.*, 1999).

En un estudio realizado sobre el efecto de la vitamina C en el crecimiento tumoral, se descubrió que el ascorbato tiene un efecto negativo sobre la expresión de HIF-1 α , lo que planteó la cuestión de que la vitamina C podría inhibir la adaptación a la hipoxia inducida por el tumor sólido (Li y Schellhorn, 2007). Esto podría explicar el efecto significativo de la disminución en la expresión de HIF-1 α en cuerpos lúteos de ovejas sometidas a un ambiente hipóxico y suplementadas con vitaminas antioxidantes. Este estudio demostró en general que la suplementación con vitaminas antioxidantes disminuye la expresión de VEGF en las ovejas sometidas a hipoxia hipobárica. Estos resultados se han observado en estudios realizados en

otros tejidos. Por ejemplo, se ha demostrado en cultivos celulares de fibroblastos en presencia de VEGF y vitamina E, que esta vitamina actúa como un potente factor antiangiogénico, disminuyendo la expresión del receptor de VEGF, lo que resulta en la inhibición de la angiogénesis (Miyazawa *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que la vitamina E reduce la liberación de la proteína angiogénica VEGF en células tumorales humanas (Schindler y Mentlein, 2006). Un estudio realizado para evaluar el efecto conjunto de la vitamina C y E en la expresión de VEGF en hipercolesterolemia porcina, demostró que la expresión de VEGF se induce en la hipercolesterolemia mediante el aumento del estrés oxidativo y HIF-1 α es uno de los mecanismos de señalización implicados (Rodríguez *et al.*, 2005). En nuestro estudio se observó una relación similar entre ambos compuestos, sin embargo, esto no se reflejó en las ovejas nativas de la altura, lo que hace suponer un mecanismo adaptativo que las diferencia de los otros grupos. La prevención del aumento en la expresión de VEGF podría ayudar a explicar los efectos beneficiosos de las vitaminas C y E en la hipercolesterolemia inducida en aterosclerosis experimental (Rodríguez *et al.*, 2005).

CONCLUSIÓN

La hipoxia de altura induce una sobreexpresión de HIF-1 α y VEGF tanto en el folículo preovulatorio como en el cuerpo lúteo. Esto puede ser parte de un mecanismo adaptativo para incrementar la vascularización de estos tejidos y con ello el aporte de oxígeno. Además, las vitaminas antioxidantes reducen el efecto de la altura sobre la expresión de ambas proteínas, lo que sugiere la presencia de estrés oxidativo asociado a la hipoxia hipobárica. Aunque este último efecto podría tender a reducir la vascularización ovárica, ello podría ser compensado por una mejora en la capacitancia del lecho vascular, lo que tendería a mejorar la funcionalidad de las estructuras ováricas.

REFERENCIAS

Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 3:28-49.

Álvarez-Arroyo M, Yagüe S, González-Pacheco F, Castilla M, Suzuki Y, Jiménez S. Papel del VEGF en la respuesta celular a la agresión. *Nefrología.* 2003; 23: 54-57.

Al-zi'abi M, Watson E, Fraser H. Angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the equine corpus luteum. *Reproduction.* 2003; 125:259-270.

Aquino A, González G. El papel del factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1) en la fibrosis pulmonar idiopática. *Neumol Cir Torax.* 2010; 69: 171-177.

Basini G, Bianco F, Grasselli F, Tirelli M, Bussolati S, Tamanini C. The effects of reduced oxygen tension on swine granulosa cell. *Regul Pept.* 2004; 120: 69-75.

Beall C. Two routes to functional adaptation: Tibetan and Andean high-altitude natives. *Pnas.* 2007; 114: 8655-8660.

Caramelo C, Peña J, Castilla A, Justo S, De Solis A, Neria F. Respuesta a la hipoxia, un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica. *Medicina (B Aires).* 2006; 66: 155-164.

Censo. Instituto Nacional de Estadística. Estadísticas sociales de los pueblos indígenas de Chile. Santiago: Maval Publicaciones; 2002. 201 p.

Chihuailaif R, Contreras P, Wittwer F. Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Vet Méx.* 2002; 33: 265-283.

Córdova A, Saltijeral O, Ruiz G, Xolalpa V, Cortés S, Peña S, Córdova C, Córdova M, Méndez M, Huerta R, Juárez M, Guerra J. Estrés oxidativo en gametos. *Redvet.* 2010; 11: 1-32.

Daponte A, Ioannou M, Mylonis I, Simos G, Minas M, Messinis I. Prognostic significance of Hypoxia Inducible Factor 1 alpha (HIF-1alpha) expression in serous ovarian cancer: an immunohistochemical study. *Bmc Cancer*. 2008; 8:335-345.

Di Giulio C, Bianchi G, Cacchio M, Artese L, Rapino C, Macri M, Di Ilio C. Oxygen and life span: chronic hypoxia as a model for studying HIF-1 α , VEGF and NOS during aging. *Respir Physiol Neuro*. 2005; 147:31-38.

Dosek A, Ohno H, Acs Z, Taylor A, Radak Z. High altitude and oxidative stress. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007; 158: 128-131.

Fraser H, Wulff C. Angiogenesis in the corpus luteum. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003; 1:88-98.

Girish V, Vijayalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/ImageJ. *Indian J Cancer*. 2004; 41:1-47.

González G. Peruvian contributions to the study on human reproduction at high altitude: From the chronicles of the Spanish conquest to the present. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007; 158: 172-179.

Gutiérrez M. Estrés oxidativo en la gestación, una nueva óptica en la atención de la embarazada. *Rev Cubana Obstet Ginecol*. 2005; 31: 1-11.

Horiuchi A, Imai T, Shimizu M, Kenji O, Cuiju W, Nikaido T, Konishi I. Hypoxia-induced changes in the expression of VEGF, HIF-1 α and cell cycle-related molecules in ovarian cancer cells. *Anticancer Res*. 2002; 22: 2697-2702.

Huddleston B, Ataman E, De Salvo P, Zanetti M, Bloise M, Bel J. Towards a GIS based analysis of mountain environments and populations. Environment and natural resources working paper N°10. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations; 2003. 26 p.

- Julio M.** Participación del factor de crecimiento nervioso en la regulación de la angiogénesis ovárica. Tesis Doctor en Bioquímica. Santiago: U de Chile, Fac Cs Químicas y Farmacéuticas; 2006. 108 p.
- Kai K.** The role of hypoxia inducible factors in regulating ovarian function. Thesis Doctor of Philosophy in Medicine. Adelaide: U of Adelaide, School of Paediatrics and Reproductive Health; 2009. 172 p.
- Landvik S, Diplock A, Packer L.** Efficacy of vitamin E in human health and disease. In: Cardenas E, Packer L, editors. Handbook of antioxidants. 2° ed. New York: Marcel Dekker Inc; 2002. p. 75-97.
- Li H, Ren Y, Guo S, Cheng L, Wang D, Yang J.** The protein level of hypoxia-inducible factor-1 α is increased in the plateau pika (*Ochotona curzoniae*) inhabiting high altitudes. *J Exp Zool.* 2009; 311A: 134-141.
- Li Y, Schellhorn E.** New Developments and Novel Therapeutic Perspectives for Vitamin C. *J Nutr.* 2007; 137: 2171-2184.
- Marín-Hernández A.** El factor inducido por la hipoxia-1 (HIF-1) y la glucólisis en las células tumorales. *Rev.* 2009; 28: 42-51.
- Mier J, Aburto T, Muñoz X, Aguayo P, García E, Hernández C.** Efecto del consumo de una dieta rica en vitaminas C y E sobre marcadores de estrés oxidativo periférico en mujeres con endometriosis. *Perinatol Reprod Hum.* 2008; 22: 250-260.
- Miyazawa T, Tsuzuki T, Nakagawa K, Igarashi M.** Antiangiogenic Potency of Vitamin E. *Acad Sci.* 2004; 1031: 401-404.
- Moreno S, Marrodan D, Dipierri J.** Peso al nacimiento en ecosistemas de altura. Noroeste argentino: Susques. Observatorio Medioambiental. 2003; 6: 161-176.
- Nishimura R, Okuda K.** Hipoxia is important for establishing vascularization during corpus luteum formation in cattle. *J Reprod Dev.* 2010; 56: 110-116.

Olfert I, Breen E, Mathieu-Costello O, Wagner P. Chronic hypoxia attenuates resting and exercise-induced VEGF, flt-1, and flk-1 mRNA levels in skeletal muscle. *J Appl Physiol.* 2001; 90: 1532-1538.

Oltmanns K, Gehring H, Rudolf S, Schultes B, Hackenberg C, Schweiger U, Born J, Fehm H, Peters A. Acute hypoxia decreases plasma VEGF concentration in healthy humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2005; 290: E434-E439.

Padayatty S, Daruwala R, Wang Y, Eck P, Song J, Koh W. Vitamin C: From molecular actions to optimum intake. In: Cardenas E, Packer L, editors. *Handbook of antioxidants.* 2° ed. New York: Marcel Dekker Inc; 2002. p. 117-145.

Palacios C, Blanco M. Presentación del ovario y del útero en el ciclo sexual de la oveja, obtenida por grabación en video vía laparoscopia. *Reproduccion.* 2000; 25: 575-580.

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

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

Parraguez V, Atlagich M, Behn C, Bruzzone M, Raggi L. Fertility in ewes at high altitude: comparison between animals with long- and short-time residence at high altitude and the effect of antioxidant vitamins. (abstract). *Reprod Domest Anim.* 2006a; 41: 372.

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

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

Pialoux V, Mounier R, Brown A, Steinback C, Rawling J, Poulin M. Relationship between oxidative stress and HIF-1 α mRNA during sustained hypoxia in humans. *J Free Radic Biol Med.* 2008; 46: 321-326.

Rivas P, Rodríguez-Márquez J, Hernández A. 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. *Rev Cient, Fcv-Luz.* 2006; 16: 347-352.

Robinson R, Woad K, Hammond A, Laird M, Hunter M, Mann G. Angiogenesis and vascular function in the ovary. *Reproduction.* 2009; 138:869-881.

Rodríguez J, Nespereira B, Pérez-Illzarbe M, Eguinoa E, Páramo J. Vitamins C and E prevent endotelial VEGF and VEGFR-2 overexpression induced by porcine hypercholesterolemic LDL. *Cardiovasc Res.* 2005; 65: 665-673.

Rosales A, Guzmán S. Apoptosis en la atresia follicular y la regresión del cuerpo lúteo. *Téc Pecu Méx.* 2008; 46: 159-182.

Rosales-Torres A, Alonso I, Vergara M, Romano M, Castillo-Juárez H, Ávalos A. Vascular endothelial growth factor isoforms 120, 164 and 205 are reduced with atresia in ovarian follicles of sheep. *Anim Reprod Sci.* 2010; 122: 111-117.

Schindler R, Mentlein R. Flavonoids and Vitamin E Reduce the Release of the Angiogenic Peptide Vascular Endothelial Growth Factor from Human Tumor Cells. *J Nutr.* 2006; 136: 1477-1482.

Siega-Riz A, Promislow J, Savitz D. Vitamin C intake and the risk of preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2003; 189: 519-25.

Silver E, Eskenazi B, Evenson D, Block G, Young S, Wyrobek A. Effect of antioxidant intake on sperm chromatin stability in healthy nonsmoking men. *J Androl.* 2005; 26: 550-556.

Stroka D, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger R, Neil D, Bauer C, Gassmann M, Candinas D. HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *Faseb J.* 2001; 15: 2445-2453.

Tamanini C, De Ambrogi M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reprod Dom Anim.* 2004; 39:206-216.

Tuder R, Flook B, Voelkel N. Increased Gene Expression for VEGF and the VEGF Receptors KDR/Flk and Flt in Lungs Exposed to Acute or to Chronic Hypoxia. *J Clin Invest.* 1995; 95:1798-1807.

Wagner P. El factor HIF-1 inducido por la hipoxia y la sensibilidad al oxígeno. Rol del hierro intracelular. *Acta Med Per.* 2011; 28: 163-168.

Woods R, Plessinger M, Miller R. Vitamin C and E: Missing links in preventing preterm premature rupture of membranes? *Am J Obs Gynecol.* 1999; 185: 5-10.

Zamudio S, Kovalenko O, Vanderline J, Illsley N, Heller D, Belliappa S, Perkins A. Chronic Hypoxia *In Vivo* Reduces Placental Oxidative Stress. *Placenta.* 2007: 846-853.