



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS ANIMALES**



**“EFECTOS DEL MEDIOAMBIENTE NORMÓXICO Y DE LAS VITAMINAS C Y E SOBRE
CARACTERÍSTICAS PLACENTARIAS EN OVEJAS PREÑADAS ORIGINARIAS DEL
ALTIPLANO CHILENO”**

KARLA ANDREA CARMONA ARAYA

Memoria para optar al título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales.

PROFESOR GUÍA: VICTOR HUGO PARRAGUEZ GAMBOA

**SANTIAGO - CHILE
2011**

RESUMEN: Los efectos de un ambiente hipóxico sobre la gestación son conocidos. Sin embargo, existe poca información sobre como el ambiente normóxico afectaría la gestación de individuos adaptados a la vida en altura. Este estudio se basa en la consideración que individuos adaptados a un ambiente hipóxico han desarrollado mecanismos que les permite transportar y utilizar el oxígeno más eficientemente en esas condiciones, por lo que frente a un aumento de la presión parcial de oxígeno ambiental éstos pueden desarrollar estrés oxidativo, tal como se observa en hiperoxia. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del ambiente normóxico y de la administración de vitaminas C y E sobre las características placentarias, en ovejas originarias de la altura que cursan su gestación a nivel del mar. Se utilizaron 10 ovejas provenientes de la altura (HL) y 10 del nivel del mar (LL), las que desarrollaron su gestación a 500 msnm. La mitad de cada grupo fue suplementado diariamente con 500 mg de vitamina C y 350 UI de vitamina E. Entre los 96 y 100 días de gestación se evaluaron las características placentarias y la presencia de los factores angiogénicos VEGF y leptina, mediante la técnica de Western Blot. El peso de la placenta fue mayor en el grupo LL en comparación con HL. Las características número de placentomas y superficie de placentomas no mostraron diferencias significativas, mientras que la suplementación con antioxidantes no evidenció cambios significativos para las características antes mencionadas. La expresión de VEGF no reflejó cambios significativos entre los grupos, sin embargo en la porción fetal del placentoma, la expresión de VEGF en los animales LL, tiende a ser mayor. La terapia antioxidante pareció disminuir la expresión de VEGF, aunque esta diferencia no fue significativa. La expresión de leptina disminuyó en los grupos suplementados con vitaminas, siendo esta diferencia significativa en la porción fetal del placentoma. El HL muestra la mayor superficie vascular por placentoma, la que disminuyó al suplementar con vitaminas. De los resultados obtenidos se desprende que la exposición a la normoxia en ovejas gestantes adaptadas a la vida en altura, no produciría cambios placentarios compatibles con un estado de estrés oxidativo. Sin embargo, quedan muchas preguntas sin responder que requerirán estudios posteriores.

Palabras clave: placenta, ovino, VEGF, leptina, antioxidante.

ABSTRACT: The effects of a hypoxic environment on pregnancy are known. However, there is scarce information on the effects of the normoxic environment on the pregnancy in individuals adapted to high altitude. This study is based on the consideration that individuals adapted to a hypoxic environment have developed mechanisms allowing them to carry and use oxygen more efficiently under these conditions, therefore, when exposed to an increase in environment oxygen partial pressure, these individuals may develop oxidative stress as observed in the hyperoxia. The aim of this work was to study the effect of normoxic environment and administration of vitamins C and E on placental characteristics in sheep adapted to high altitude, gestating at sea level. Ten ewes from high altitude (HL) and 10 from sea level (LL) were used, which developed their pregnancy at 500 m altitude. Half of each group was supplemented daily with 500 mg of vitamin C and 350 IU of vitamin E. Between 96 and 100 days of gestation, placental characteristics and the presence of angiogenic factors VEGF and leptin, by Western Blot, were evaluated. Placental weight was higher in the LL groups than in HL. Number of placentomes and placentome surface showed no significant difference. Antioxidant supplementation showed no significant changes in the placental characteristics. The expression of VEGF showed no significant changes between groups, however, in the fetal portion of the placentome, the expression of VEGF in animals LL, tends to be higher. Antioxidant therapy appeared to decrease the expression of VEGF, although this difference was not significant. The expression of leptin was lower in the groups supplemented with vitamins, but only in the fetal portion of the placentome this difference was significant. The HL group showed the largest placentome vascular surface, which decreased when supplemented with vitamins. These results suggest that exposure to normoxia in ewes adapted to life in high altitude, would not produce placental changes consistent with a state of oxidative stress. However, there are still many unanswered questions that require further studies.

Key Words: placenta, ovine, VEGF, leptin, antioxidant.

INTRODUCCIÓN

La placenta es una aposición funcional de tejido materno y tejido fetal (Sammin *et al.*, 2009) y es el órgano a través del cual gases respiratorios, nutrientes y desechos son intercambiados entre el sistema fetal y materno durante la gestación (Reynolds *et al.*, 2005).

Por definición, la placenta se desarrolla en todos los mamíferos euterios (placentarios), sin embargo la forma de placentación definitiva difiere entre las distintas especies, de acuerdo a criterios anatómicos que consideran básicamente los tejidos maternos y fetales involucrados (Sammin *et al.*, 2009).

Macroscópicamente, la placenta ovina está compuesta por 60 a 100 unidades conocidas como placentomas, los que se encuentran separados de manera relativamente uniforme sobre la superficie de las membranas fetales. Cada uno de estos placentomas está conformado de una porción materna, denominada carúncula, y una porción fetal, llamada cotiledón. Estas dos porciones se interdigitan entre sí, por lo que se encuentran estrechamente relacionadas (Reynolds *et al.*, 2005). En ovejas el componente fetal de los placentomas está formado de la fusión del corion avascular y el alantoides vascular, los que aumentan su área de superficie por el desarrollo de vellosidades, las cuales se agrupan en los mencionados cotiledones (Sammin *et al.*, 2009). Las carúnculas maternas están presentes en la superficie del endometrio desde poco después del nacimiento y su número y localización permanece constante a través de la vida de la hembra. Las carúnculas crecen durante el embarazo y regresan a su tamaño no gestacional durante cada periodo post parto. Las carúnculas son puntos especializados de contacto entre las

membranas fetales y el endometrio, por lo que su ubicación determina la ubicación final de los placentomas (Reynolds *et al.*, 2005).

Según el método de clasificación de Grosser, el cual se basa en la observación del número de capas interpuestas entre la circulación materna y fetal en las diferentes especies (Sammin *et al.*, 2009), la placenta ovina se clasifica como epiteliocorial, lo que significa que el corion fetal está en contacto directo con el epitelio uterino materno (Reynolds *et al.*, 2005). En este tipo de placentación, todas las capas (endotelio, tejido conectivo y epitelio) están intactas en ambos lados de la placenta (Sammin *et al.*, 2009). La placenta ovina también se puede clasificar como un subgrupo de la epiteliocorial, llamada sindesmocorial o sinepitelial, lo que indica que el epitelio uterino está fusionado con células coriónicas binucleadas que forman un sincicio feto-maternal (Reynolds *et al.*, 2005). En mamíferos con placentación epiteliocorial, el corioalantoides es mínimamente invasivo, permaneciendo el epitelio uterino intacto durante la gestación. En este sentido, la placenta ovina es un modelo ideal para estudiar el desarrollo placentario, ya que las porciones materna y fetal permanecen asociadas cercanamente, pero completamente intactas durante la gestación, por lo que se puede evaluar cada tejido en forma separada (Reynolds *et al.*, 2005).

El desarrollo del sistema vascular juega un rol clave para asegurar un adecuado intercambio transplacentario (Reynolds *et al.*, 2005). Se ha sugerido que el gran incremento en el intercambio transplacentario, que soporta la tasa de crecimiento exponencial del feto durante la última mitad de la gestación, depende principalmente del crecimiento del lecho vascular placentario y el resultante aumento en el flujo sanguíneo uterino y

umbilical (Borowicz *et al.*, 2007). Es por esto que un adecuado flujo sanguíneo hacia la placenta es crítico para un crecimiento fetal normal y no es sorprendente que condiciones que afecten el crecimiento del feto, como el genotipo materno y fetal, aumento en el número de fetos, exceso o privación de nutrientes en la madre o estrés medioambiental, tengan efectos similares sobre el crecimiento de la placenta y estén asociados con disminución en las tasas de absorción de oxígeno y nutrientes por parte del feto, como también con disminución de la angiogénesis y el flujo sanguíneo (Reynolds *et al.*, 2010).

Numerosos estudios (Charnock-Jones *et al.*, 2004; Kaufmann *et al.*, 2004; Mayhew *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 2007 a, b; Borowicz *et al.*, 2007) indican que la angiogénesis es el principal componente en el aumento del flujo sanguíneo, siendo clave para el incremento en el intercambio transplacentario a través de la gestación (Reynolds *et al.*, 2010). Este crecimiento de la vasculatura no ocurre de la misma forma en el cotiledón y en la carúncula. La microvasculatura del compartimiento materno de la placenta está compuesto casi exclusivamente por capilares muy grandes, lo que conduce a una baja velocidad de flujo sanguíneo, diseñado principalmente como un sistema de entrega de nutrientes y oxígeno (y, a la inversa, como un sistema removedor de desechos). En cambio, la arquitectura microvascular de la placenta fetal, está altamente ramificada y compuesta principalmente de abundantes capilares pequeños, diseñados como un sistema de transporte a alta velocidad. (Reynolds *et al.*, 2005). De esta forma, la arquitectura microvascular de los ovinos es ideal tanto para la entrega de nutrientes por el lado materno, como para la absorción y transporte de

nutrientes por el lado fetal (Reynolds *et al.*, 2010).

La angiogénesis es la formación de nuevos lechos vasculares a partir de vasos preexistentes y es un proceso crítico para el crecimiento y desarrollo de todos los tejidos, incluyendo la placenta (Borowicz *et al.*, 2007). Este proceso es regulado por un cambio en el equilibrio local entre los factores angiogénicos y sus inhibidores. Los factores reguladores de la angiogénesis incluyen: citoquinas, hormonas y factores de crecimiento; hipoxia e hipoglicemia; estrés; componentes de la matriz extra celular (laminina, fibronectina); etc. Los factores proangiogénicos más relevantes son el Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Leptina, Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) y angiopoyetinas (Zygmunt *et al.*, 2003).

El VEGF, llamado también VEGF-A, es uno de los mayores factores de crecimiento angiogénico de la placenta, y ha sido implicado en la angiogénesis fetal (Reynolds *et al.*, 2005). Es un mitógeno altamente específico para las células endoteliales, del cual han sido descritas 5 isoformas. Además, existen otros miembros adicionales en la familia VEGF: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el Factor de Crecimiento Placentario (PlGF). El VEGF presenta 2 receptores específicos: VEGFR-1 y VEGFR-2. Los receptores son expresados en las células endoteliales y en forma soluble en el suero materno durante la gestación (sólo VEGF-1). El VEGFR-2 actúa como regulador positivo sobre las acciones mitogénicas, antiapoptóticas y de mejoramiento de la permeabilidad, mientras que el VEGFR-1 funciona como regulador negativo de las acciones del VEGF sobre el endotelio vascular por secuestro del ligando. Las acciones del VEGF incluyen no sólo activación mitogénica de células endoteliales, sino que también la inducción de proteasas séricas y colagenasas, aumento de la quimiotaxis y vasodilatación. La expresión

génica de VEGF es regulada por la tensión de oxígeno, diversos factores de crecimiento, citoquinas y hormonas placentarias (Zygmunt *et al.*, 2003).

Diversos estudios (Cheung *et al.*, 1995; Cheung y Brace, 1999; Bogic *et al.*, 2000) han demostrado que la placenta ovina produce VEGF a través de la gestación y que la expresión de este factor de crecimiento varía según se trate de tejido placentar materno (carúncula) o fetal (cotiledón), además del tiempo de gestación. Por ejemplo, Reynolds y Redmer (2001), demostraron que la expresión del mRNA de VEGF, en la preñez temprana, es mayor en el tejido placentario fetal comparado con el tejido placentario materno, mientras que en la preñez tardía, el mRNA permanece alto en los placentomas y en las membranas intercotidelonarias fetales. También demostraron que durante la preñez temprana, la proteína VEGF se localiza en la microvasculatura cotiledonar en desarrollo, sin embargo en preñez tardía, la proteína VEGF se encuentra principalmente en los vasos de la carúncula materna, con sólo una parte de las arteriolas cotiledonarias fetales exhibiéndola. En un estudio más reciente, Reynolds *et al.* (2005), demostraron que no sólo VEGF y su mRNA muestran diferentes patrones de expresión en el tejido caruncular y cotiledonario, sino que también sus receptores. Para la carúncula, la expresión de VEGF aumenta ligeramente, mientras que la expresión de sus receptores, especialmente VEGF-1, se incrementa dramáticamente durante la gestación. En contraste, en el cotiledón, el aumento de VEGF y VEGF-1 es ligero, y la expresión de VEGF-2 no cambia durante la gestación.

Otro factor que parece tener un rol importante en el crecimiento placentario y fetal es la hormona leptina. Esta hormona tipo

citoquina es capaz de ejercer múltiples funciones. La función mejor caracterizada es la regulación de la ingesta de alimentos y el gasto energético. En este sentido, la leptina es producida y secretada por el tejido adiposo blanco (Flier, 1995). Durante los últimos años, se han identificado efectos pleiotrópicos de la leptina, los que consisten en la modulación de varios procesos, tales como termogénesis, homeostasis, angiogénesis, hematopoyesis, osteogénesis, condrogénesis, funciones inmune y neuroendocrinas, así como de control de la presión arterial (Maymó *et al.*, 2008). Otras pruebas también han implicado a la leptina en funciones reproductivas, como la regulación de la función del ovario, la maduración de oocitos, el desarrollo del embrión y la implantación (Sagawa *et al.*, 2002). Sin embargo, la completa regulación de la producción de leptina aún es poco conocida (Maymó *et al.*, 2009).

Las principales evidencias que sugieren que la leptina podría cumplir un rol durante la preñez son que las concentraciones de leptina plasmática durante la gestación son dos veces mayores que en estado de no gravidez, que es producida por la unidad feto-placentaria y que su producción es irregular en varias patologías de la preñez, en asociación con alteraciones del crecimiento fetal (Hauguel-de Mouzon *et al.*, 2005). Estudios en ovinos han demostrado que las concentraciones de leptina fetal están inversamente correlacionadas con el tamaño fetal y placentario, y, al igual que en el caso humano, las concentraciones plasmáticas de leptina materna no están correlacionadas con el peso del feto al nacimiento (Buchbinder *et al.*, 2001).

Los roles propuestos para la leptina en la gestación humana incluyen la regulación del crecimiento y desarrollo fetal, angiogénesis en el feto y placenta, y hematopoyesis embrionaria (Buchbinder *et al.*, 2001). A pesar

de esto, un estudio reciente indica que no existe relación entre las concentraciones de leptina materna y el peso fetal o la masa de grasa fetal (Lepercq *et al.*, 2003), en cambio las concentraciones de leptina umbilicales exhiben una fuerte correlación positiva con la masa de grasa de los neonatos, pero no está correlacionada con el peso al nacimiento (Okereke *et al.*, 2002). El rol regulador del crecimiento de la placenta que se le ha atribuido a la leptina concuerda con los efectos que ésta provoca. Por ejemplo, la leptina induce la producción de Gonadotropina Coriónica Humana (hCG) en las células del trofoblasto, aumenta la mitosis, estimula la absorción de aminoácidos y aumenta la síntesis de proteínas de la matriz extracelular y metaloproteinasas (Hauguel-de Mouzon *et al.*, 2005).

El origen del alza en las concentraciones de leptina durante la gestación no se conoce con certeza, pero existe fuerte evidencia que sugiere que es la placenta, y no el tejido adiposo materno, la que hace una contribución sustancial al aumento de las concentraciones de leptina materna. Varias evidencias apoyan lo anterior. En primer lugar, el aumento de leptina precede al aumento fisiológico en el índice de masa corporal materno (IMC) al final del segundo trimestre. En segundo lugar, las concentraciones de leptina disminuyen rápidamente después del parto, en la madre y en el recién nacido. Un 95% de la leptina sintetizada en la placenta es liberada al compartimiento materno y sólo un 5% es liberada en la circulación fetal. Este porcentaje puede parecer pequeño si lo comparamos con el lado materno, sin embargo es mucho más alto que otras hormonas de origen placentario, como por ejemplo el lactógeno placentario y la gonadotropina coriónica (Hauguel-de Mouzon *et al.*, 2005).

Numerosos investigadores han demostrado que un ambiente de hipoxia crónica causa una gama de alteraciones en la placenta y en el neonato. Humanos nacidos en la altura son más pequeños que aquéllos que nacen a nivel del mar, independientemente del estatus económico materno, grupo étnico u otros factores de riesgo (Giussani *et al.*, 2001; Mortola *et al.*, 2000; Jensen and Moore, 1997). Para el caso de ovinos, se ha demostrado que en un ambiente hipóxico el crecimiento intrauterino y peso al nacimiento del cordero disminuyen independiente del tiempo de residencia de la oveja a alta altitud y aumenta el peso de la placenta (Parraguez *et al.*, 2005). Además, el ambiente hipóxico natural impacta la placenta ovina, observándose incremento del diámetro de los cotiledones, de la superficie de contacto cotiledón-carúncula y el área de los cotiledones que es ocupada por lumen vascular. Sin embargo, disminuye el número total de cotiledones. Además, ovinos nativos de baja altitud, que gestan en la altura, aumentan la superficie de contacto cotiledón-carúncula y el área de cotiledón ocupada por lumen vascular (Parraguez *et al.*, 2006).

La expresión de VEGF, es estimulado por la hipoxia a través de un proceso transcripcional mediado por el factor hipoxia-inducible-1 (HIF-1) (Regnault *et al.*, 2002). Parraguez *et al.* (2010), demostraron a través de ensayo inmunohistoquímico, que la expresión de VEGF placentario fue significativamente mayor en ovejas que llevaron a cabo su gestación en altura en comparación con aquellas que desarrollaron su preñez a nivel del mar.

La hipoxia también juega un rol importante en el aumento de la expresión de VEGF-1 y VEGF-2, aunque no en la misma magnitud que con VEGF. Estas alteraciones en la transcripción y estabilidad de mRNA podrían

promover una desorganizada angiogénesis y una desfavorable orientación de los vasos, perturbando potencialmente el transporte de oxígeno y nutrientes al feto (Regnault *et al.*, 2002).

Largos periodos de hipoxia también ejercen profundos efectos sobre la concentración de leptina circulante, la expresión de leptina en los adipositos y la expresión de los receptores de leptina en el feto ovino a término. Ducsay *et al.* (2006) observaron un aumento de 3 veces en las concentraciones de leptina en el plasma fetal, en respuesta a largos periodos de hipoxia, junto con un significativo incremento de mRNA de leptina en el tejido adiposo blanco (periadrenal). En forma similar, los niveles de mRNA en la placenta también fueron elevados. Es conocido que en el adulto, la leptina es codificada por un gen hipoxia-inducible, y según los antecedentes anteriormente mencionados, se puede inferir que la leptina también es codificada por un gen hipoxia-inducible en el adipocito del feto ovino (Ducsay *et al.*, 2006).

La exposición natural o artificial a un ambiente de hipoxia hipobárica constituye una injuria fisiológica importante, la que incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), generando una condición de estrés oxidativo. Aunque la gestación puede ser definida como un estado de estrés oxidativo, gestaciones patológicas presentan un gran incremento de biomarcadores de estrés oxidativo, los cuales aumentan 5 veces en alta altitud comparada con baja altitud (Myatt and Cui 2004; Keyes *et al.* 2003). El estatus oxidativo puede influenciar el desarrollo placentario por modificación de la expresión de factores proangiogénicos (Agarwal *et al.*, 2005).

Bajo condiciones normales, los antioxidantes endógenos convierten las ROS en agua, para prevenir el estrés oxidativo. Existen dos tipos de antioxidantes, los enzimáticos y los no enzimáticos. Dentro de los antioxidantes no enzimáticos, los más conocidos son la vitamina E y vitamina C (Agarwal *et al.*, 2005).

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. La vitamina E es considerada la primera línea de defensa contra la peroxidación lipídica (Landvik *et al.*, 2002).

La vitamina C es un antioxidante hidrofílico encontrado principalmente en plantas. Intracelularmente, la vitamina C podría actuar como un antioxidante para regular la expresión de genes, regular la translación de mRNA o prevenir el daño oxidativo de las proteínas intracelulares. Extracelularmente también podría tener un rol protector contra el daño oxidativo y mediadores de la oxidación. Otro mecanismo indirecto potencialmente protector, es la recuperación de la vitamina E, ya que actúa regenerando la vitamina E oxidada hacia su forma reducida, mejorando el potencial de ésta para prevenir la peroxidación lipídica. La vitamina C puede ser el antioxidante primario en el plasma en retener radicales peróxidos acuosos y productos de peroxidación lipídica (Padayatty *et al.*, 2002).

Se ha demostrado en ovinos que la suplementación de antioxidantes (vitaminas C y E) tiene un efecto significativo para prevenir el estrés oxidativo y sus consecuencias indeseables sobre el crecimiento fetal y características de la placenta en gestaciones en un ambiente hipóxico, aboliendo las diferencias entre animales con un largo o corto tiempo de residencia a alta altitud. Uno de los efectos más

sorprendentes de la suplementación de vitaminas antioxidantes en ovinos gestantes, fue el significativo incremento del peso al nacimiento, independiente del tiempo de exposición a alta altitud. Además, la administración de antioxidantes disminuye significativamente las concentraciones de biomarcadores de estrés oxidativo en el plasma. Estos biomarcadores presentaron concentraciones más altas en grupos de ovinos sin suplemento de vitaminas. Adicionalmente, el grupo de animales con un periodo de exposición corto a elevada altitud, presentaron niveles mayores de biomarcadores en términos absolutos, por lo que el estrés oxidativo fue más acentuado en este grupo (Parraguez *et al.*, 2010).

En la literatura no existe información acerca del efecto que provocaría en las variables reproductivas en animales o humanos que han vivido varias generaciones en un ambiente hipóxico, el traslado al ambiente normóxico. Sin embargo, se ha demostrado que la reoxigenación en humanos después de retornar de una altitud de 3.500 en donde permanecieron 3 días, resulta en daño oxidativo en la membrana de los eritrocitos (Gonzalez *et al.*, 2005). Además, si se considera que los individuos adaptados al medio ambiente hipóxico de altura han desarrollado mecanismos que les permiten hacer eficiente el transporte y la utilización del oxígeno bajo esas condiciones, es factible pensar que frente a un aumento en la presión parcial de oxígeno ambiental, éstos puedan desarrollar estrés oxidativo, tal como se ha demostrado en la hiperoxia (Dean *et al.*, 2003). En este sentido, se podría hipotetizar que la exposición de ovejas preñadas adaptadas a la hipoxia hipobárica durante varias generaciones, podría interpretarse como una hiperoxia relativa, por lo que esto podría inducir cambios placentarios compatibles con estrés oxidativo.

El objetivo general de éste trabajo fue estudiar el efecto del ambiente normóxico y de la administración de vitamina C y E sobre algunas características placentarias, en ovejas originarias de la altura (4.000 m.s.n.m.) que cursan su gestación a nivel del mar. Como objetivos específicos se planteó establecer, en ovejas preñadas originarias de la altura, el efecto de la normoxia y de la administración de vitamina C y E en las siguientes características:

1. Peso de la placenta.
2. Número y tamaño de los placentomas.
3. Superficie placentaria ocupada por lechos vasculares.
4. Expresión placentaria de VEGF y leptina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar:

El estudio se realizó en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Chile. Los animales se mantuvieron en las instalaciones de la granja educativa “Mundo Granja” y los procedimientos experimentales se realizaron en las dependencias del Departamento de Ciencias Biológicas Animales.

Animales:

El desarrollo de este estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y por la Comisión Asesora de Bioética del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, FONDECYT.

Se utilizaron ovejas criollas nativas del nivel del mar (LL) y ovejas criollas nativas de altura (HL), éstas últimas fueron traídas desde Caquena, localidad ubicada a 4.200 m.s.n.m. en la provincia de Parinacota, Región de Arica. Los

animales fueron trasladados a la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile en Santiago, a una altitud de aproximadamente 500 m.s.n.m., donde fueron apareadas, para comenzar su gestación en este lugar. Los animales fueron reunidos en 4 grupos de 5 miembros cada uno: LL, ovejas nativas del nivel del mar sin suplemento de vitaminas; LLV, ovejas originarias del nivel del mar suplementadas con vitaminas; HL, ovejas nativas de altura sin suplemento de vitaminas y HLV, ovejas originaria de altura suplementadas con vitaminas. Todas las ovejas fueron alimentadas con 2 kg de heno de alfalfa por día, suministrado en dos raciones. Los grupos LLV y HLV recibieron junto con la primera ración de alfalfa, 500 mg de vitamina C (Quimagro S. A., Chile) y 350 UI de vitamina E (Quimagro S. A., Chile) todos los días durante toda la gestación, de acuerdo a lo descrito por Parraguez *et al.* (2010). Todos los grupos contaron con disponibilidad de agua a libre consumo. El número de animales establecido por grupo, consideró ovejas con una sola cría en el vientre.

Protocolo de obtención de muestras:

Los animales se estudiaron entre los 96 y 100 días de gestación. Las ovejas fueron anestesiadas con Ketamina (Ketostop®, Dragpharma S. A., Chile, 20 mg/kg im) para realizar una laparotomía media infraumbilical, luego se escindió el útero y se extrajo al feto, para proceder inmediatamente a la toma de muestras de sangre de arteria y vena umbilical. A continuación, se sacrificó el feto por medio de una sobredosis barbitúrica (Tiopental sódico, Laboratorio Chile, Chile) y se instalaron catéteres de 3 mm de diámetro externo (Tygon, Akron, OH, USA) en las arterias umbilicales y arteria uterina. Luego se procedió a una histerectomía, seguida de la eutanasia de la hembra por sobredosis barbitúrica (Tiopental sódico, Laboratorio Chile, Chile). La placenta se

perfundió con cuatro litros de buffer fosfato (PBS 0,4 M, pH 7,4), con el propósito de eliminar la sangre y obtener tejido placentario limpio. Una vez infundidos los cuatro litros de buffer, se escindieron cuatro placentomas, los que fueron disecados para la obtención del lado materno y fetal. Estas muestras fueron congeladas a -80° C hasta la determinación de la expresión de VEGF y leptina. A continuación se infundieron cuatro litros de paraformaldehído al 4% en buffer fosfato, para la fijación de la placenta. Posteriormente los placentomas fueron contados, pesados, y medidos. La superficie de los placentomas fue estimada calculando su diámetro promedio y utilizando la fórmula para el cálculo de la superficie de la circunferencia: $S = \pi r^2$ (Parraguez *et al.*, 2006).

Medición de la superficie placentaria ocupada por los lechos vasculares:

Cuatro de los placentomas fijados se incluyeron en parafina, desde donde se obtuvieron cortes transversales de 6 µm. Estos fueron teñidos con hematoxilina – eosina y posteriormente observados al microscopio óptico con cámara integrada (DM1000, Leica, Wetzlar, Alemania) a una magnificación de 400X. Se obtuvieron fotografías de cuatro campos ópticos. En las fotos se evaluó el área ocupada por los lechos vasculares utilizando el programa IMAGEJ (versión 1.43 para Windows, NIH, free program).

Expresión de VEGF y leptina en tejido placentario:

Se detectó y comparó la expresión de ambos péptidos mediante el método “Western blot”. Para ello se homogeneizó 1g de tejido (materno y fetal) en 4 mL de solución tampón (Tris – HCl 50 mM pH 7,4) en presencia de

inhibidores de proteasas (leupeptín, pepstatin, PMSF y EDTA), en un sistema tipo ultraturax 13.000 r.p.m., 3 veces por 15 segundos (T10 basic, Anthos Labtec Instruments, Salzburg, Austria). Posteriormente, cada homogenizado se centrifugó a 1.000 x g por 20 minutos y se recuperó el sobrenadante, obteniendo alícuotas que fueron almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

Una alícuota de cada muestra, se utilizó para determinar la concentración de proteínas a través del método de Lowry (1951), utilizando como estándar seroalbúmina de bovino. Posteriormente, se realizó una electroforesis de acuerdo al método de Laemmli (1970), usando gel de poliacrilamida-SDS al 15% (SDS-PAGE) en condiciones desnaturizantes y reductoras. La cámara de electroforesis utilizada fue la Mini Protean III (BioRad, USA).

Las proteínas fueron transferidas a una membrana de Polivinilideno fluoruro (Inmunoblot PVDF, 0,2 μ m, BioRad Laboratories, Richmond, California) a través de electrotransferencia, considerando 40 mg de proteína por cada muestra. La membrana fue bloqueada por 30 minutos en una solución hecha con 6% de leche en polvo descremada en un buffer TBS-T (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl y 0,05% de Tween 20, pH 7,6). Posteriormente la membrana son lavadas con buffer TBS-T, 3 veces por 10 minutos cada vez, para luego ser incubada toda la noche a 4°C con anticuerpo primario policlonal preparado en conejo para VEGF (anti VEGF A-120; sc-152, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA; dilución 1:1000 en solución de 6% de leche descremada en polvo en buffer TBS-T) y Leptina, (anti-ob A-20; sc-842, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA; dilución 1:150 en solución de 6% de leche descremada en polvo en buffer TBS-T). Luego de lavarse la membrana con buffer TBS-T, 3 veces por 10 minutos cada vez, ésta es incubada por una

hora con anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rabanita (goat anti-rabbit IgG-HRP; sc-2030, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA; dilución 1:10000 en solución de 6% de leche descremada en polvo en buffer TBS-T).

El revelado se realizó a través de sistema de quimioluminiscencia (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate, n° cat 34075, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA), que generó bandas fluorescentes donde existió reacción positiva. Estas bandas fueron expuestas a una película fotosensible (CL-Xposure Film 5x7 pulgadas, Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, USA), la cual fue escaneada para luego ser sometida a densitometría con un programa computacional (Un-Scan-It Gel versión 4.1 para Windows, 1996, Silk Scientific, Inc., Utha, USA) que cuantificó los píxeles correspondientes a cada banda detectada. Los píxeles obtenidos fueron normalizados utilizando la banda correspondiente a β -actina como patrón interno, quedando los datos expresados en unidades relativas (ur).

Todos los reactivos utilizados en el desarrollo de éste estudio corresponden a Sigma-Aldrich, con excepción de los especialmente mencionados.

Análisis de los datos:

Los datos fueron expresados como promedio \pm desviación estándar. Estos se analizaron mediante ANOVA, utilizando el software Statistica versión 7 (Stat Soft, INC., 2004, OK, USA).

RESULTADOS

Características Placentarias

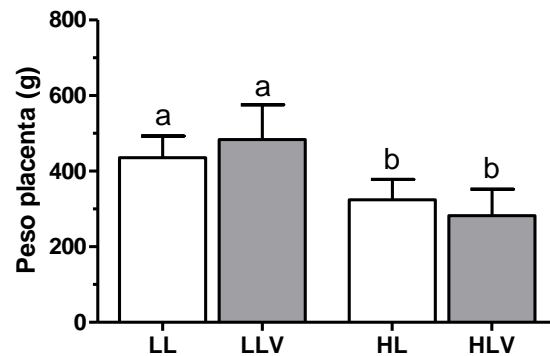
Las características placentarias analizadas fueron el peso de la placenta, el número de placentomas y la superficie de los placentomas.

Para la característica peso de la placenta (fig. 1), los resultados reflejan que existe una diferencia significativa entre los grupos originarios del nivel del mar comparados con los grupos de originarios de altura, siendo menor en estos últimos.

La suplementación con antioxidantes no mostró diferencias significativas entre los grupos. A pesar de esto, existe una tendencia a un mayor peso placentario en el grupo LLV cuando se compara con su control (LL). Para los grupos originarios de altura, al ser suplementados con vitaminas el peso de la placenta tiende a disminuir.

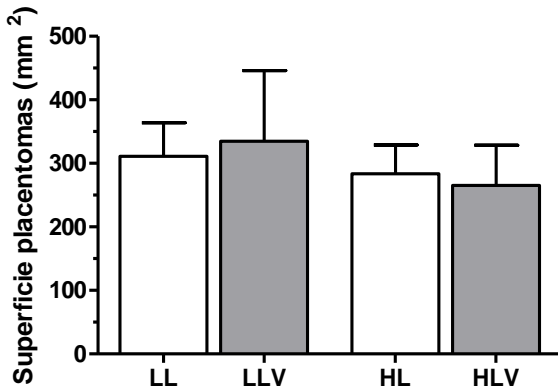
En el caso de las características número de placentomas y superficie de placentomas, los resultados obtenidos no revelaron diferencias significativas entre los grupos estudiados (Fig. 2 y 3).

Fig. 1
Peso placentario en ovejas de 90-100 días de gestación, en preñeces desarrolladas a nivel del mar.



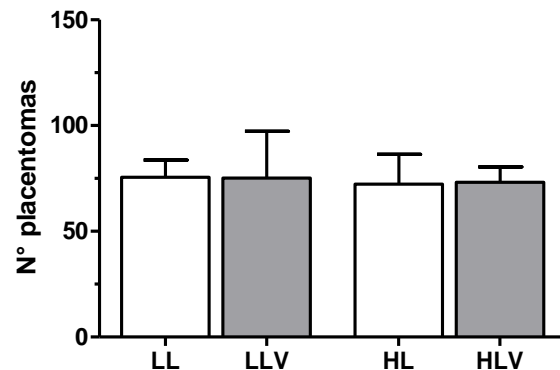
Letras distintas indican diferencia significativa entre los grupos; $p < 0,05$.
LL: Grupo de animales originario de nivel del mar;
LLV: Grupo de animales originario de nivel del mar, suplementado con vitaminas;
HL: Grupo originario de altura;
HLV: Grupo originario de altura, suplementado con vitaminas.

Fig. 3
Superficie de placentomas en ovejas de 90-100 días de gestación, en preñeces desarrolladas a nivel del mar.



LL: Grupo de animales originario de nivel del mar;
LLV: Grupo de animales originario de nivel del mar, suplementado con vitaminas;
HL: Grupo de animales originarios de altura;
HLV: Grupo de animales originarios de altura, suplementados con vitaminas.

Fig. 2
N° de Placentomas en ovejas de 90-100 días de gestación, en preñeces desarrolladas a nivel del mar.

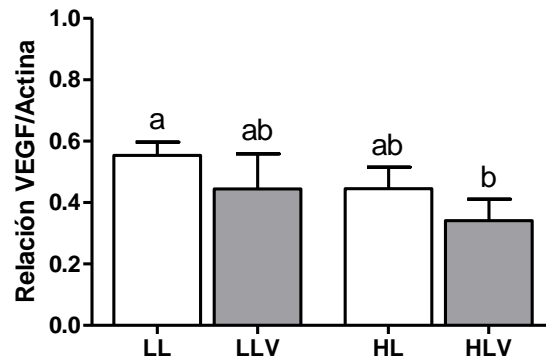


LL: Grupo de animales originario de nivel del mar;
LLV: Grupo de animales originario de nivel del mar, suplementado con vitaminas;
HL: Grupo de animales originarios de altura;
HLV: Grupo de animales originarios de altura, suplementados con vitaminas.

Expresión del Factor de Crecimiento Endotelial (VEGF)

Los resultados obtenidos mediante Western Blot reflejaron la presencia de la proteína en el tejido placentario de todos los grupos estudiados. En la porción materna del placentoma (Fig. 4), la expresión de VEGF tuvo un comportamiento similar en los grupos estudiados, siendo distintos sólo los grupos LL y HLV. La terapia antioxidante mostró una disminución de la expresión de VEGF en los dos grupos suplementados (LLV, HLV), en comparación con sus pares sin tratamiento (LL, HL), sin embargo esta diferencia fue modesta y no significativa.

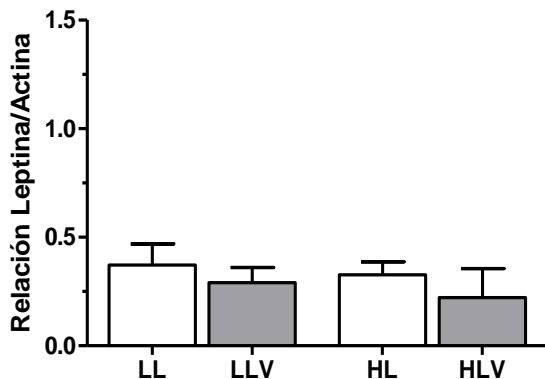
Fig. 4
Expresión de VEGF en placenta materna en ovejas de 90-100 días de gestación, en preñeces desarrolladas a nivel del mar.



Letras distintas indican diferencia significativa entre los grupos; $p < 0.05$.
 LL: Grupo de animales originario de nivel del mar;
 LLV: Grupo de animales originario de nivel del mar, suplementado con vitaminas;
 HL: Grupo originario de altura;
 HLV: Grupo originario de altura, suplementado con vitaminas.

Fig. 6

Expresión de Leptina en placenta materna en ovejas de 90-100 días de gestación, en preñeces desarrolladas a nivel del mar.



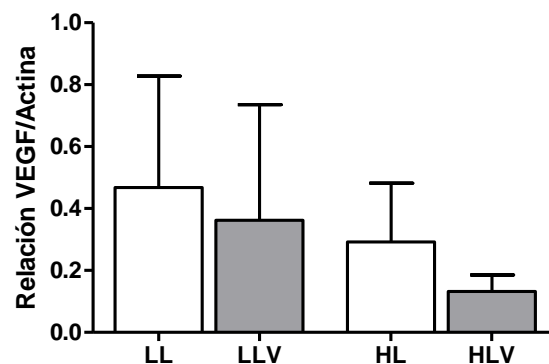
LL: Grupo de animales originario de nivel del mar;
 LLV: Grupo de animales originario de nivel del mar, suplementado con vitaminas;
 HL: Grupo originario de altura;
 HLV: Grupo originario de altura, suplementado con vitaminas.

En la porción fetal de la placenta (Fig. 5), a pesar que no se observó diferencias significativas, el grupo LL mostró una tendencia a mayor expresión de la proteína en comparación con el grupo HL. Ambos grupos suplementados con vitaminas (LLV, HLV) evidenciaron una tendencia a disminuir la expresión de VEGF en comparación con sus grupos controles (LL, HL).

Expresión de Leptina

Los resultados obtenidos para la expresión de placenta materna y fetal se presentan en las figuras 6 y 7 respectivamente. Éstos muestran que la proteína Leptina se expresó en todos los grupos analizados.

Fig. 5
Expresión de VEGF en placenta fetal en ovejas de 90-100 días de gestación, en preñeces desarrolladas a nivel del mar.

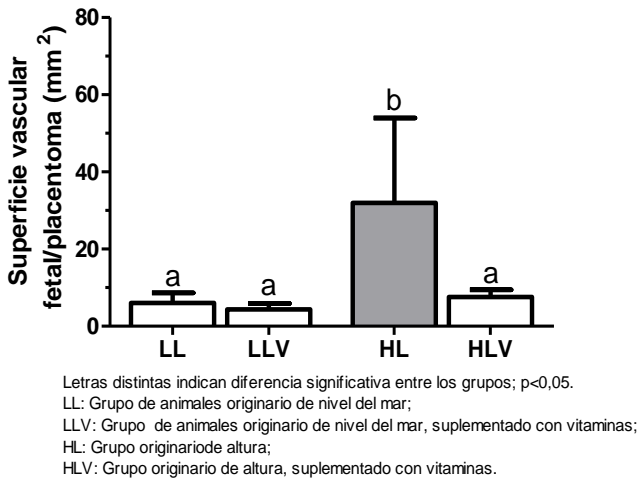


LL: Grupo de animales originario de nivel del mar;
 LLV: Grupo de animales originario de nivel del mar, suplementado con vitaminas;
 HL: Grupo originario de altura;
 HLV: Grupo originario de altura, suplementado con vitaminas.

En la carúncula no se evidenció diferencia significativa entre los grupos, sin embargo se observa una tendencia que indica

que los grupos sometidos a tratamiento antioxidante, mostraron menor expresión de Leptina en comparación con sus grupos controles.

Fig. 9
Superficie Vascular Fetal/Placentoma en ovejás de 90-100 días de gestación, en preñeces desarrolladas a nivel del mar.



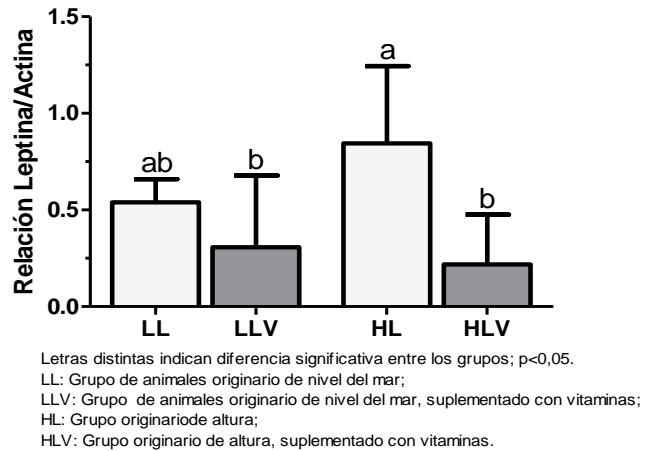
En la porción fetal del placentoma, el grupo de animales originarios de altura sometidos a suplementación con vitaminas (HLV), mostró una menor expresión de la proteína, al ser comparados con su grupo control (HL), siendo esta diferencia significativa.

Superficie Vascular

Los resultados obtenidos para la superficie vascular total por placentoma se muestran en la figura 8.

Los resultados reflejan que el grupo HL originario de altura, muestra la mayor superficie vascular por placentoma en comparación con el grupo control LL.

Fig. 7
Expresión de Leptina en placenta fetal en ovejás de 90-100 días de gestación, en preñeces desarrolladas a nivel del mar.



La suplementación con vitaminas no evidenció diferencias significativas entre los grupos LL y LLV, sin embargo si se muestra una marcada disminución en el grupo suplementado HLV, en comparación con su grupo control (HL).

Fig. 8
Superficie Vascular Total/Placentoma en ovejás de 90-100 días de gestación, en preñeces desarrolladas a nivel del mar.

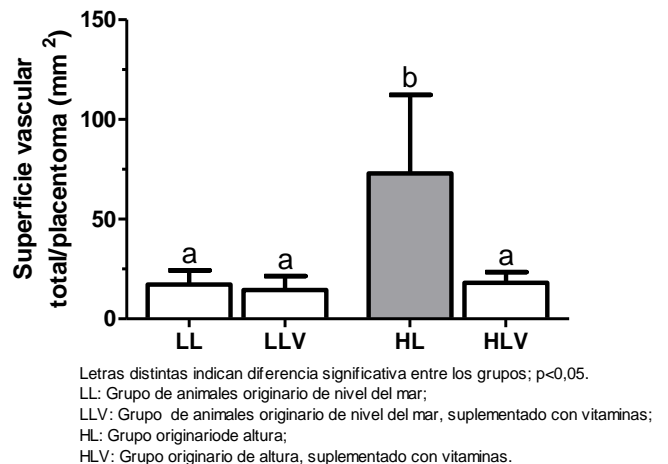
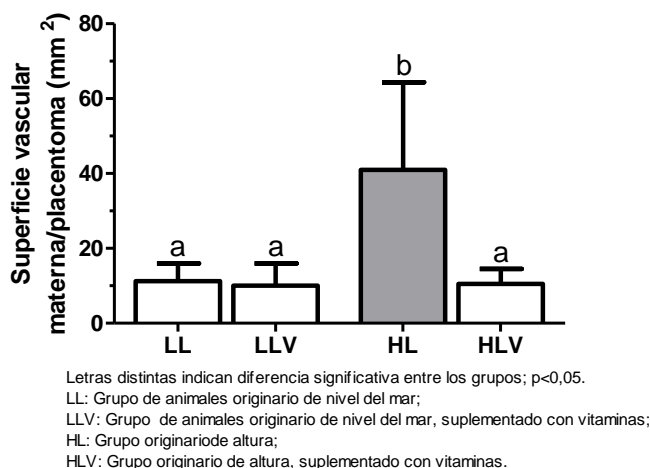


Fig. 10
Superficie Vascular Materna/Placentoma en
ovejas de 90-100 días de gestación, en preñeces
desarrolladas a nivel del mar.



Para el caso de las mediciones realizadas en las porciones fetal y materna en forma separada, los resultados obtenidos muestran que la superficie vascular se comporta de manera similar al placentoma completo, reflejando que el grupo HL presenta la mayor superficie vascular (Fig. 9 y 10)

DISCUSIÓN

En la presente investigación, se lograron evidenciar los posibles efectos de la exposición a la normoxia en animales adaptados al ambiente hipobárico e hipóxico, sobre la placenta ovina. Además, se pudo identificar los potenciales efectos que tendría sobre las características placentarias la suplementación de antioxidantes. En nuestro conocimiento, no existen investigaciones previas que estudien los tópicos anteriormente mencionados.

La característica placentaria peso de la placenta fue mayor en los grupos originarios de zonas bajas, comparados con aquellos provenientes de la altura. La suplementación con antioxidantes no fue significativa para

ninguno de los grupos. En trabajos previos, en donde se estudiaron las características de la placenta de término en gestaciones desarrolladas en altura, se observó que el mayor peso de la placenta la presentó el grupo de ovejas nativas de la altura, teniendo un aumento menos marcado las ovejas nativas del nivel del mar, debido a su menor tiempo de adaptación al medioambiente hipóxico. (Parraguez *et al.*, 2006). Un resultado similar se obtuvo con placentas de 100 días de gestación en preñeces en altura (Alegría, 2010). En ambos estudios la suplementación con vitaminas revertió éste efecto.

En el presente estudio, las placentas nativas del nivel del mar pesaron aproximadamente un 85% más en comparación a las de altura, a diferencia de los estudios anteriores (Parraguez *et al.*, 2006; Alegría, 2010). Nuestros resultados, sumados a la información previa, podrían sugerir que las adaptaciones placentarias ocurridas para compensar los efectos de la hipoxia son revertidas cuando los animales son expuestos a la normoxia, inhibiéndose significativamente el crecimiento placentario.

Investigaciones previas (Parraguez *et al.*, 2005, 2006, 2010; Alegría, 2010) mostraron que los animales originarios de zonas altas presentaban un menor número de placentomas comparados con animales originarios de zonas bajas. Además, los grupos tratados con vitaminas aumentaron el número de placentomas, disminuyendo el efecto de la hipoxia sobre ovejas gestantes en altura. Los resultados de la presente investigación, reflejaron que los placentomas se presentaban en menor número a lo observado por Parraguez y Alegría, sin evidenciar diferencias entre los grupos suplementados con vitaminas y sus controles, presentándose más bien de forma homogénea, demostrándose que la terapia

antioxidante no tendría ningún efecto sobre ésta característica, contrario a los datos informados en las investigaciones anteriores. Estos resultados parecen sugerir que el ambiente normóxico normaliza el número de placentomas, revirtiendo los efectos provocado por la exposición a la hipoxia hipobárica.

Los resultados obtenidos para la característica superficie de placentomas, no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, Parraguez *et al.* (2006) demostraron que, en preñeces ovinas de término, la superficie de los placentomas fue mayor en los grupos que llevaron cabo su preñez en un ambiente de hipoxia hipobárica (altiplano) en comparación con los grupos que gestaron a nivel del mar. Además, la suplementación con vitaminas disminuyó considerablemente la superficie de los placentomas (Parraguez *et al.*, 2010). Resultado similar se obtuvo a los 100 días de gestación (Alegría, 2010), aunque en este caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Al igual con lo que ocurre para las características peso placentario y número de placentomas, los resultados obtenidos de ésta investigación sugieren que en el medioambiente normóxico parecen revertirse las adaptaciones compensatorias que se desarrollan cuando los animales desarrollan su gestación expuestos a un ambiente hipóxico.

El VEGF es uno de los mayores factores angiogénicos de la placenta, aumentando sus niveles en el plasma a medida que la gestación avanza, coincidentemente con el aumento del desarrollo vascular (Reynolds 2005; Zygmunt *et al.*, 2003). Mujeres que han cursado su gestación en un ambiente de hipoxia hipobárica, presentan mayores niveles de VEGF en el plasma en comparación a sus controles que gestaron en normoxia (Reynolds *et al.*,

2005), presentando un incremento crónico de la angiogénesis.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, para el análisis de la expresión de VEGF en la placenta de ovejas que desarrollaron su preñez a nivel del mar, reflejaron que la presencia de VEGF tuvo una tendencia, aunque no significativa, a ser mayor en los grupos originarios de zonas bajas (estadísticamente significativo en la porción materna), mientras que fue menor en los grupos provenientes del altiplano. Debido a que el VEGF es un importante factor de crecimiento angiogénico de la placenta y que el tamaño de la placenta depende fundamentalmente del crecimiento vascular (Reynolds, et al. 2005), los resultados obtenidos son consistentes con la disminución del peso placentario en los grupos provenientes de la altura. Considerando que la expresión de VEGF es estimulada por la hipoxia (Regnault *et al.*, 2002), su mayor presencia en placentas de gestaciones en altura es coherente (Parraguez et al., 2010; Alegría, 2010).

Estudios anteriores han demostrado que la expresión de Leptina es mayor en gestaciones desarrolladas en un medioambiente hipóxico (Grosfeld *et al.*, 2001; Hauguel-de Mouzon *et al.*, 2005; Ducsay *et al.*, 2006; Alegría, 2010) y ya se ha establecido que su expresión es estimulada por baja tensión de oxígeno a través del factor HIF-1, al igual como ocurre con VEGF (Grosfeld *et al.*, 2001). Los resultados de la presente investigación evidenciaron que la Leptina presentó niveles de expresión similares entre los grupos en la porción materna. Por otro lado, en la porción fetal, fue el grupo HL el que expresó la mayor cantidad de la hormona. De los antecedentes anteriores se podría inferir que en ovejas adaptadas a la vida en altura, la exposición a un medioambiente normóxico paliaría los efectos producidos por la hipoxia sobre la expresión y

niveles de la hormona en la placenta ovina, de forma similar a lo que ocurriría con el peso de la placenta, número de placentomas y superficie de los placentomas.

La terapia antioxidante pareció disminuir la expresión de ambas proteínas, aunque esta diferencia solo fue estadísticamente significativa para leptina fetal en grupos nativos de altura. Estos resultados concuerdan con estudios que han demostrado que la suplementación con vitaminas C y E disminuye la expresión de VEGF y Leptina en gestaciones desarrolladas en altura (Alegría, 2010; Parraguez, 2010), sin embargo el efecto de la terapia antioxidante de éstos trabajos, fue más marcado en comparación con los resultados obtenidos en la presente investigación. Esta diferencia puede ser explicada por el estrés oxidativo que desarrollan los animales en un medioambiente hipóxico. Los ROS son una de las vías por las que el complejo HIF es activado, el cual a su vez estimula la expresión de VEGF y leptina (Klimova y Chandel, 2008), por lo que es factible pensar que al existir una fuente adicional de antioxidantes, estos puedan contrarrestar de mejor manera los efectos provocados por la sobreproducción de ROS. En el caso de nuestra investigación, los efectos sobre la expresión de VEGF y leptina que tendría la suplementación con vitaminas fueron menos notorios, por lo que es posible pensar que los animales desarrollaron un estado de estrés oxidativo menos marcado.

La superficie vascular fetal, materna y total se comportó de forma similar, observándose que los animales originarios de zonas de alta altitud presentaron una mayor superficie vascular por placentoma. Este resultado coincide con estudios realizados en ovejas que llevaron a cabo su gestación en altura, donde los animales originarios del altiplano presentaron las mayores superficies

vasculares por placentoma (Parraguez et al., 2006). Esta característica tal vez no responda a cambios en la concentración de oxígeno ambiental y sí a cambios oxidoreductivos, como lo sugieren los efectos de las vitaminas antioxidantes en el grupo de ovejas originarias del altiplano.

Los resultados obtenidos son tal vez contradictorios, ya que como se mencionó, uno de los mayores factores angiogénicos de la placenta es el VEGF (Reynolds, et al. 2005), por lo que podría esperarse que animales con mayor superficie vascular por placentoma, también debieran ser los con mayores niveles de VEGF. Sin embargo, los datos muestran que los niveles de VEGF son menores en los grupos de animales originarios de altura. En este aspecto no conocemos una explicación para este resultado, pero no podemos descartar los efectos de otros factores inductores de angiogénesis no estimulados por la hipoxia. La Leptina también es considerada como un pro-angiogénico placentario (Buchbinder *et al.*, 2001), por lo que de manera similar al VEGF, debiera esperarse su mayor expresión en los grupos con mayor superficie vascular, lo que sólo ocurre en la porción fetal, aunque este resultado no fue estadísticamente significativo. Otra explicación posible sería inferir que la sensibilidad a los factores angiogénicos es mayor en animales nativos de zonas de alta altitud, lo que explicaría su mayor desarrollo de vasculatura en comparación con los otros grupos. Sin embargo, el alcance de esta investigación no resuelve esta problemática.

Estados de estrés oxidativo durante la gestación causan una serie de alteraciones y patologías como son preeclampsia y restricción del crecimiento fetal intrauterino entre otras (Jauniaux et al., 2006; Agarwal et al., 2005). Estos estados de gestaciones alteradas provocan menores pesos al nacimiento,

mayores pesos de placenta y desarrollo vascular placentario alterados (Parraguez et al., 2010). Nuestra hipótesis indica que animales desarrollados en ambiente hipóxico ya están adaptados a la vida con baja presión parcial de oxígeno, por lo que la exposición a normoxia podría ser interpretada como una hiperoxia relativa, pudiendo llevar también a un estado de estrés oxidativo, como describe Dean et al. (2003). Sin embargo, los resultados del presente trabajo no apoyan nuestra hipótesis.

En conclusión, la exposición a la normoxia durante la gestación de ovejas adaptadas al medioambiente hipóxico, no produce cambios placentarios compatibles con un estado de estrés oxidativo. Sin embargo quedan muchas preguntas aún por responder, que requerirán investigaciones posteriores.

BIBLIOGRAFÍA

- Agarwal, A., Gupta, S., y Sharma, R. (2005). Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology* **3**: 1-28.
- Alegría, D. (2010). Efectos de la terapia antioxidante sobre la expresión y localización placentaria de VEGF, NOS y Leptina en ovejas que cursan su gestación en hipoxia hipobárica. Memoria (Título Médico Veterinaria). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 21 p.
- Bogic, L., Brace, R. y Cheung, C. (2000) Cellular localization of VEGF in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta* **21**: 203–209.
- Borowicz, P., Arnold, D., Johnson, M., Grazul-Bilska, A., Redmer, D. y Reynolds, L. (2007). Placental Growth Throughout the Last Two Thirds of Pregnancy in Sheep: Vascular Development and Angiogenic Factor Expression. *Biology of Reproduction* **76**: 256-267.
- Buchbinder, A., Lang U., Baker, R. S., Khoury, J. C., Mershon, J., y Clark, K. E. (2001). Leptin in the ovine fetus correlates with fetal and placental size. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **185**: 786-791.
- Charnock-Jones, D., Kaufmann P. y Mayhew, T. (2004). Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* **25**: 103-113.
- Cheung, C. y Brace, R. (1999). Developmental expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in ovine placenta and fetal membranes. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* **6**: 179-185.
- Cheung, C., Madhu, S., Ebaugh, M. y Brace, R. (1995). Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **173**: 753–759
- Dean, J. B., Mulkey, D. K., Henderson, III, R. A., Potter, S. J., y Putnam, R. W. (2003). Hyperoxia, reactive oxygen species, and hyperventilation: oxygen sensitivity of brain stem neurons. *Journal of Applied Physiology*. **96**: 784-791.
- Ducsay, C. A., Hyatt, K., Mlynarczyk, M., Kaushal, L. K. M., y Myers, D. A. (2006). Long-term hypoxia increase leptin receptors and plasma leptin concentrations in the late-gestation ovine fetus. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **291**: 1406-1413.
- Flier, J. (1995). The adipocyte: storage depot or node on the energy information 448 superhighway?. *Cell* **80**:15-18

- Giussani, D. A., Phillips, P.S., Anstee, S., y Barker, J. P. (2001). Effects of altitude versus economic status on birth weight and body shape at birth. *Pediatric Research* **49**: 490-494.
- González, G., Celedón, G., Escobar, M., Sotomayor, C., Ferrer, V., Benítez, D. y Behn, C. (2005). Red cell membrane lipid changes at 3,500 m and on return to sea level. *High Altitude Medicine and Biology* **6**: 320-326.
- Grosfeld, A., Turbana, S., André, J., Cauzac, M., Challier, J., Hauguel-de Mouzon, S. y Guerre-Millo, M. (2001). Transcriptional effect of hypoxia on placental leptin. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **502**: 122-126.
- Grosfeld, A., André, J., Hauguel-de Mouzon, S., Berra, E., Pouysségur, J. y Guerre-Millo, M. (2002). Hypoxia-inducible factor 1 transactivates the human leptin gene promoter. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 42953-42957.
- Hauguel-de Mouzon, S., Lepercq, J. y Catalano, P. (2005). The know and unknow of leptin in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **194**: 1537-1545.
- Jauniaux, E., Poston, L. y Burton, G. (2006). Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Human Reproduction Update* **12**: 747-755.
- Jensen, G. M., y Moore, L. G. (1997). The effect of high altitude and other risk factors on birthweight: independent or interactive effects?. *American Journal of Public Health* **87**: 1003-1007.
- Kaufmann, P., Mayhew, T., Charnock-Jones, D. y D. (2004). Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* **25**: 114-126.
- Keyes, L., Armaza, J., Niermeyer, S., Vargas, E., Young, D. y Moore, L. (2003). Intrauterine growth restriction, preeclampsia and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. *Pediatric Research* **54**: 20-5.
- Klimova, T. y Chandel, N. S. (2008). Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death and Differentiation* **15**: 660-666.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Landvik, S.H. V., Diplock, A. T., y Packer, L. (2002). Efficacy of vitamin E in Human Health and Disease. Cap.4. In: *Handbook of antioxidants*. 2ª Ed. Cardenas E., Packer L. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. N.Y. U.S.A, s/p.
- Lepercq, J., Guerre-Millo, M., Andre, J., Cauzac, M. y Hauguel-de Mouzon, S. (2003). Leptin: a potential marker of placental insufficiency. *Obstetrics and Gynecology* **55**: 151-5.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *The Journal of Biological Chemistry* **193**: 265-275.
- Mayhew, T., Charnock-Jones, D. y Kaufmann, P. (2004). Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* **25**: 127-139.
- Maymó, J. L., Pérez, A., Sánchez-Margalet, V., Dueñas, J. L., Calvo, J. C., y Varone, C. L. (2009).

- Upregulation of placental leptin by human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* **150**: 304-313.
- Mortola, J. P., Frappel, P. B., Agüero, L., y Armstrong, K. (2000). Birth weight and altitude: a study in Peruvian communities. *Journal of Pediatrics* **136**: 324-329.
- Myatt, L. y Cui, X. (2004). Oxidative stress in placenta. *Histochemistry and Cell Biology* **122**: 369-382.
- Okereke, N., Uvena-Cellebreeze, J., Huston-Presley, L., Amini, S., y Catalano, P. (2002). The effect of gender and gestational diabetes mellitus on cord leptin concentration. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **187**:798-803.
- Padayatty, S. J., Daruwala, R., Wang, Y., Eck, P. K., Song, J., Koh, W. S., y Levine, M. (2002). Vitamin C: From molecular actions to optimum intake, Cap.4. In: *Handbook of antioxidants*. 2ª Ed. Cardenas E., Packer L. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. N.Y. U.S.A, s/p.
- Pagé, E., Chan, D., Giaccia, A., Levine, M. y Richard, D. (2008). Hypoxia-inducible factor-1 α stabilization in nonhypoxic conditions: Role of oxidation and intracellular ascorbate depletion. *Molecular Biology of the Cell* **19**: 86-94.
- Parraguez, V. H., Atlagich, M., Díaz, R., Bruzzone, M. E., Behn, C., y Raggi, L. A. (2005). Effect of hypobaric hypoxia on lamb intrauterine growth: comparison between high- and low-altitude native ewes. *Reproduction, Fertility and Development* **17**: 497-505.
- Parraguez, V. H., Atlagich M., Díaz, R., Cepeda, R., Gonzáles, C., De Los Reyes, M., Bruzzone, M. E., Behn, C. y Raggi, L. A. (2006). Ovine placenta at high altitudes: Comparison of animal with different times of adaptation to hypoxic environment. *Animal Reproduction Science* **95**: 151-157.
- Parraguez, V. H., Atlagich, M., Urquieta, B., Galleguillos, M., De los Reyes, M., Kooyman, D. L., Araneda, S. y Raggi, L.A. (2010). 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.* **74**:193-199.
- Parraguez, V. H., Atlagich, M., Areneda, O., García, C., Muñoz, A., De los Reyes, M. y Urquieta, B. (2010). Effect of antioxidant vitamins on newborn and placental traits in gestations at high altitude: comparative study in high- and low-altitude native sheep. *Reproduction, Fertility and Development*. En Prensa.
- Regnault, T., Orbus, R., De Vrijer, B., Davidsen, M., Wilkening, R., y Anthony, R. (2002). Placental expression of VEGF, PIGF and their receptors in a model of placental insufficiency - intrauterine growth restriction (PI-IUGR). *Placenta* **23**: 132-144.
- Reynolds, L., Borowicz, P., Caton, J., Vonnahme, K., Luther, J., Buchanan, D., Hafez, S., Grazul-Bilska, A y Redmer, D. (2010). Uteroplacental vascular development and placental function: an update. *The International Journal of Developmental Biology* **54**: 355-365.
- Reynolds, L., Borowicz, P., Vonnahme, K., Johnson, M., Grazul-Bilska, A., Redmer, D., y Caton, J. (2005a). Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *Rev. The Physiological Society* **565.1**: 43-58.
- Reynolds, L., Borowicz, P., Vonnahme, K., Johnson, M., Grazul-Bilska, A., Wallace, J.,

Caton, J y Redmer, D. (2005b). Animal Models of Placental Angiogenesis. *Placenta* **26**: 689-708.

Reynolds, L., y Redmer, D. (2001). Angiogenesis in placenta. *Biology of Reproduction* **64**: 1023-1040.

Sammin D., Markey, B., Bassett, H. y Buxton, D. (2009). The ovine placenta and placentitis-A review. *Veterinary Microbiology* **135**: 90-97.

Sagawa, N., Yura, S., Itoh, H., Mise, H., Kakui, K., Korita, D., Takemura, M. Nuamah, M., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Nakao, K. y Fujii, S. (2002). Role of leptin in pregnancy-a review. *Placenta* **23**: 80-86.

Zygmunt, M., Herr, F., Munstedt, T. K., Lang, U., y Liang, O. D. (2003). Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* **110**: 10-18.