



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Departamento de Ciencias Biológicas Animales



Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

***“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”***

DENIS CAROLINA ALEGRIA YAÑEZ

PROFESOR GUÍA:
DR. VÍCTOR H. PARRAGUEZ GAMBOA.

Santiago, Chile
2010

RESUMEN: La vida en altura se ve afectada debido a la presencia de un continuo estrés ambiental producido por la existencia de la llamada hipoxia hipobárica, la cual aumenta su severidad a mayor altura, debido a la caída de la presión parcial de oxígeno. Este estudio se basa en que el efecto directo de la hipoxia hipobárica sobre la gestación en ovinos es mediado por un estado de estrés oxidativo, que podría afectar la normal expresión y localización de los principales factores angiogénicos encargados del normal desarrollo placentario y fetal. Esto llevaría a la presencia de bajos pesos al nacimiento, mayor peso de placenta con modificaciones en el desarrollo vascular, número y tamaño de los placentomas, entre otras. A partir de esto evaluamos el efecto de la terapia con vitaminas antioxidantes sobre la expresión y localización del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), hormona Leptina, enzimas eNOS, iNOS y nNOS, y su influencia sobre el desarrollo placentario y fetal. Para el estudio se utilizaron 10 ovejas pertenecientes a la altura (HH) y 10 al nivel de mar (LH), que fueron mantenidas durante todo su periodo de gestación a 3580 msnm. La mitad de cada grupo fue suplementado diariamente con 500 mg de vitamina C y 350 UI de vitamina E. A los 100 días de gestación se midieron gases sanguíneos y concentración plasmática de las vitaminas antioxidantes, se evaluaron características fetales y placentarias y fueron extraídos los placentomas para la evaluación mediante la técnica de inmunohistoquímica de los factores angiogénicos. No se evidenció presencia de las enzimas iNOS y nNOS. La expresión de los demás factores aumentó debido al estado de hipoxia, y mostró una disminución significativa gracias a la terapia antioxidante, sin modificar en ningún caso la localización de éstos. Los gases sanguíneos evidenciaron la presencia de un estado hipoxémico. Las concentraciones sanguíneas de vitaminas C y E fueron significativamente mayores en los animales suplementados. El peso fetal aumentó en los animales suplementados junto con la disminución del peso de la placenta y aumento del número de placentomas, además se observó una disminución en la superficie vascular, logrando, con todo esto, una similitud a aquellas características observadas en ovejas preñadas a nivel del mar. Por lo tanto, la mayor expresión de estos factores angiogénicos en condiciones de hipoxia hipobárica produce alteraciones tanto a nivel fetal como placentario debido a la presencia de un estado de estrés oxidativo, que pueden ser prevenidas por el uso de terapia antioxidante, logrando un desarrollo gestacional equivalente al de una preñez ovina a nivel de mar.

Palabras claves: Hipoxia Hipobárica, placenta, ovino, factores angiogénicos, antioxidante.

ABSTRACT: The life at high altitudes is affected by a continuous environmental stress produced by the hypobaric hypoxia, which becomes more severe with increasing altitude because the decrease of environmental oxygen levels. This study assesses the hypothesis that the direct effect of hypobaric hypoxia in ovine gestation is mediated by oxidative stress that could affect the normal expression and localization of main angiogenic factors responsible for normal placental and fetal development. This results in lower birth weights, increased placental weight with changes in vascular development, cotyledonary number and diameter, among others. We evaluated the effect of antioxidant vitamins therapy on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Leptin hormone, eNOS, iNOS and nNOS enzymes expression and localization, and its influence on placental and fetal development. Ten ewes from high altitude (HH) and ten from low altitude (LH) were maintained through all pregnancy at 3580 masl. Half of each group was daily supplemented with 500 mg vitamin C and 350 IU vitamin E. At 100 days of gestation arterial blood gases and plasma vitamins concentration were measured. Placental and fetal characteristics were evaluated, and the cotyledons removed for evaluation of angiogenic factors using immunohistochemical technique. This technique did not show iNOS and nNOS enzymes presence, however, the other factors expression was increased due to the hypoxemic state, and significantly decreased with the antioxidant therapy, without changes in their placental distribution. The blood gases showed the presence of a hypoxemic state. The plasma vitamin concentrations were significantly higher in supplemented ewes. Fetal weight was higher in supplemented groups with lower placental weight and an increase in cotyledons number, moreover the vascular surface was decreased, achieving, with all this changes, a similarity to that observed in pregnant ewes at the sea level. Therefore, increased expression of angiogenic factors with hypobaric hypoxia affects placental and fetal development due to the presence of an oxidative stress state. It can be prevented with antioxidant therapy, achieving a similar gestational development to that observed in pregnant ewes at the sea level.

Key Words: Hypobaric Hypoxia, placenta, ovine, angiogenic factors, antioxidant.

INTRODUCCIÓN

La capacidad de adaptación ha permitido al humano y a algunos animales la ocupación de entornos con características ambientales complejas para la vida, como la altura.

En América se han encontrado evidencias de vida humana sobre los 4000 m de altura con antigüedad de 10.000 años en lugares como Lauricocha, Huanuco (3850m), Telarmachay y San Pedro de Cajas (4400m), en Perú. Es probable que 10.000 años sea suficiente tiempo para lograr una adaptación a través de la selección natural. Sin embargo, en el siglo 16 la conquista española en el Perú inició una mezcla importante de genes con la población aborigen de la zona. Esto podría haber detenido o revertido el proceso adaptativo llevado a cabo durante estos 10.000 años de vida en altura. Según crónicas de la época en el tiempo de la conquista española los efectos de la altura, tal como la “enfermedad aguda de montaña”, se comenzaron a manifestar en los conquistadores, efectos que en aquella época fueron atribuidos al frío (Gonzales, 2007).

El principal estrés ambiental que se produce en altura se debe a la hipoxia hipobárica, que produce hipoxia fisiológica (menor cantidad de oxígeno que el 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, como se puede observar en la figura 1 (Beall *et al.*, 2007).

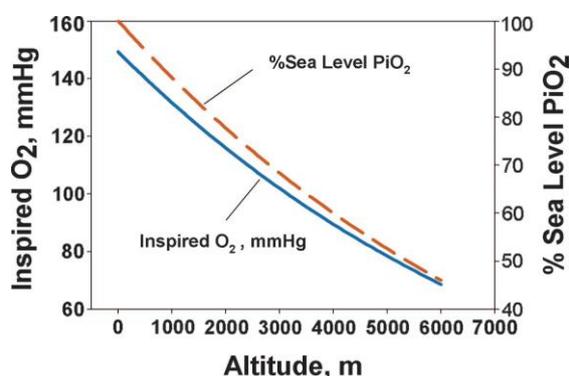


Figura 1: Niveles de oxígeno ambiental, medidos según la presión parcial de oxígeno (línea continua) o como porcentaje de valores a nivel del mar (línea discontinua), que decrecen a mayor altura, situación llamada “Hipoxia Hipobárica”. La atmósfera contiene cerca de un 21% de O₂ a todas las altitudes (Beall *et al.*, 2007).

Muchos autores sugieren que la hipoxia de altura actúa como un estrés que puede, de muchas formas, afectar la reproducción. Esto se ha comprobado en estudios hechos tanto en poblaciones humanas como animales (Gonzales, 2007). Se describe que

durante la conquista española, fue difícil para la población conquistadora tener partos viables en regiones sobre los 4000 m de altura, todo esto en contraste con la alta fecundidad y sobrevivencia observada en los Incas nativos de gran altitud. Los efectos de la altura en reproducción fueron estudiados primero en ovejas, cabras, gatos y conejos. Estos estudios demostraron que la exposición aguda a grandes alturas resulta en una infertilidad transitoria (Gonzales, 2007). La hipoxia de altura tiene efectos también sobre la mortalidad neonatal. En las tierras altas del Perú se promedian de 50 a 60 muertes por cada 1000 nacimientos viables, aproximadamente el doble de lo que ocurre en las tierras bajas. La asociación de la mortalidad neonatal con la vida en altura parece no desaparecer cuando otras variables son consideradas (cuidados de la salud, factores socioeconómicos, edad de la madre, complicaciones por hipertensión, etc.) (Gonzales, 2007; Julian *et al.*, 2007). A grandes alturas el crecimiento fetal es lento y el recién nacido es más pequeño, lo que resulta en un incremento de la mortalidad neonatal y de infantes. Datos demográficos de Perú (INEI, 2001) mostraron que los rangos de mortalidad neonatal (menores de 28 días de nacidos) y post-neonatal (28 días a 1 año) fueron mayores en altura que al nivel del mar o en la selva (Gonzales, 2007).

A nivel celular, la hipoxia produce un incremento en la producción mitocondrial de especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que lleva a un estado de estrés oxidativo. Esta es la primera fuente de generación de radicales libres durante la hipoxia, debido a una disminución en el potencial “redox” de la mitocondria, causando una producción excesiva de ROS desde la cadena transportadora de electrones, mayormente a nivel de la citocromo III. La producción excesiva de estos radicales libres y ROS *in vivo*, lleva a una serie de daños a nivel celular, incluyendo peroxidación lipídica a nivel de membrana, oxidación de proteínas y fragmentación del DNA. Todos estos efectos han sido comprobados en humanos luego de haber sido expuestos a hipoxia (Pialoux *et al.*, 2008).

Estudios en ovinos han comprobado que la hipoxia de altura afecta el desarrollo fetal y al igual que en los humanos, los recién nacidos son de bajo peso, siendo un 26-29% más livianos comparados con corderos recién nacidos a nivel del mar (Parraguez *et al.*, 2005). En contraste con el peso al nacimiento, el peso de la placenta en gestación de ovinos en altura, aumenta en un 31-41% en comparación con grupos que habitan a nivel del mar. Este significativo efecto se acompaña de

disminución del número de placentomas y aumento tanto de la superficie de contacto cotiledón-carúncula, como en la superficie vascular en los cotiledones (Parraguez *et al.*, 2005). Adicionalmente, al igual que en el caso de los humanos expuestos a hipoxia hipobárica, se ha observado el aumento de biomarcadores de estrés oxidativo en ovinos que cursan su gestación en altura y el efecto beneficioso de la administración de vitaminas antioxidantes sobre el peso de los recién nacidos (Atlagich *et al.*, 2007).

La placenta ovina a término es considerada como corioalantoidea y corioamniótica, con 60 a 100 placentomas separados, cada uno de los cuales consiste en una porción materna caruncular y fetal cotiledonaria que están interdigitadas, es decir, íntimamente fusionadas. Las capas de tejido que separan la circulación materna de la fetal en la oveja son epiteliocoriales o sinepiteliocoriales, como células del sincicio trofoblasto fusionadas con epitelio uterino (Hafez y Hafez, 2002). Los placentomas se clasifican en 4 tipos según diferencias morfológicas (A, B, C, D), predominando el tipo A por sobre los otros. Esta distribución experimenta cambios al existir exposición a la hipoxia, aumentando en estos casos los demás tipos en desmedro del tipo A (Penninga y Longo, 1998; Reynolds *et al.*, 2005).

La preñez está asociada a un gran incremento en la circulación uteroplacentaria, representada por el aumento del área capilar observada en la figura 2, la cual es la responsable de la entrega adecuada de nutrientes y oxígeno para el crecimiento fetal y placentario (Lang *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 2005).

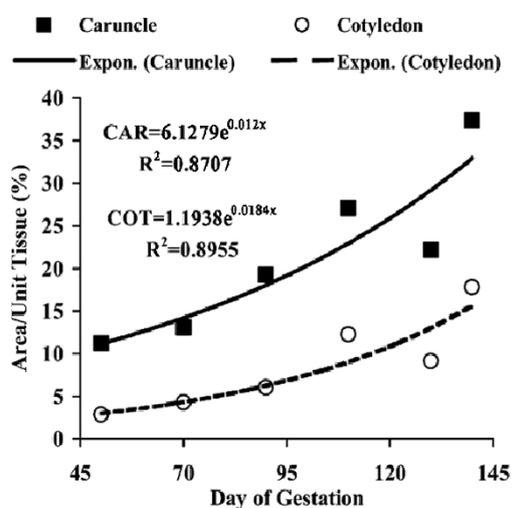


Fig. 2: Densidad del área capilar (como una proporción del área total) de la placenta materna (Carúncula) y fetal (Cotiledón). Esta se incrementa exponencialmente desde el día 50 hasta el día 140 de gestación (Reynolds *et al.*, 2005).

El endometrio, decidua y placenta son ricos en factores de crecimiento angiogénicos (Zygmunt *et al.*, 2003). La placenta debe adaptarse estructuralmente a determinados factores estresantes para aumentar su capacidad de intercambio y así optimizar el desarrollo fetal. Un estrés común al cual la placenta debe adaptarse, es la hipoxia crónica (Penninga y Longo, 1998). Este ambiente hipóxico uterino y los cambios en la tensión de oxígeno son los encargados de regular el proceso de intercambio, de ésta forma, la placenta es considerada un excelente modelo para el entendimiento de la relación entre hipoxia, organogénesis y angiogénesis (Fryer y Simon, 2006).

Se describe que el proceso angiogénico es iniciado por factores del crecimiento como el Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (bFGF), Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF), Factor de Crecimiento Placentario (PlGF), entre otros, y es regulado por cambios producidos en el equilibrio entre factores angiogénicos (dentro de los que se encuentran también la hormona Leptina, Factor de Necrosis Tumoral (TNF α), estrógenos, etc.) y sus inhibidores (Zygmunt *et al.*, 2003). Esta inducción de la angiogénesis lleva a un incremento en la densidad vascular. De esta forma decrece la distancia necesaria para lograr la difusión adecuada de oxígeno. Bajo condiciones de hipoxia, el flujo sanguíneo local es controlado por el cambio en el tono vascular a través de la activación de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y la consecuente producción de óxido nítrico (NO), además de la participación de la endotelina-1, CO (heme oxygenase 1) y otros, teniendo todos en común la participación de genes activados por el llamado Factor Inducible por la Hipoxia (HIF) (Lee *et al.*, 2004).

El HIF es una proteína heterodímera cuya función es ser el primer sensor molecular usado por el trofoblasto y el embrión en desarrollo para detectar y responder a cambios en la tensión de O₂. Este está compuesto de dos subunidades; una subunidad alfa con dos isoformas (HIF-1 α e HIF-2 α) y una subunidad beta (HIF-1 β) (Hägg y Wennström, 2005). A través de una activación transcripcional el HIF regula variados procesos celulares en respuesta a la hipoxia, incluyendo angiogénesis, migración/invasión, eritropoyesis y metabolismo celular, controlando de este modo el proceso de placentación (Fryer y Simon, 2006). Cuando la tensión de oxígeno es baja la subunidad α forma un heterodímero con la subunidad β expresada de manera constitutiva. Este heterodímero es trasladado al núcleo celular donde se une a

pequeñas regiones de DNA conocidas como “elementos de respuesta a hipoxia” en las regiones promotoras de variados genes, de esta forma activa la transcripción de éstos. Bajo condiciones de normoxia, el HIF-1 α es rápidamente hidroxilado y sometido a degradación proteosomal. Entre las variadas moléculas cuya expresión es inducida por condiciones de hipoxia vía HIF están los factores vasculogénicos como el VEGF y su receptor (VEGFR-1) (Nevo *et al.*, 2006).

El VEGF es un regulador fundamental para la angiogénesis tanto normal como anormal. Se ha demostrado que el VEGF es esencial para la vasculogénesis y angiogénesis embrionaria. Además es requerido para la proliferación cíclica de vasos en el tracto reproductivo femenino y para el crecimiento óseo longitudinal y formación endocondral de éste (Ferrara, 1999). Vonnahme *et al.* (2005) han demostrado que tanto concentraciones circulantes de VEGF en fetos de cerdo, como la expresión de mRNA de VEGF en placenta, están asociados positivamente con un incremento en la eficiencia placentaria, calculada como peso fetal dividido por peso placentario.

El VEGF como proteína ha sido localizado en células epiteliales de la placenta, en riñón y en hígado fetales, tanto en humanos como en especies animales (Cheung y Brace, 1998). En el ovino, el VEGF, ha sido descrito en la placenta y membranas fetales y, por lo tanto, se le atribuye un rol en la regulación de la vascularización y permeabilidad de la red microvascular en estos tejidos (Cheung *et al.*, 1995; Bogic *et al.*, 2000; Cheung, 1997). Sin embargo, las acciones biológicas del VEGF en tejidos ovinos no han sido caracterizadas.

La expresión de las formas tanto secretadas como asociadas a células del VEGF en la placenta y membranas fetales son consistentes con la posibilidad de que el VEGF actúa de forma paracrina para regular ambas acciones, angiogénesis y permeabilidad de los microvasos en estos tejidos.

La localización de esta molécula ha sido detectada en su máxima expresión durante el último tercio de gestación en la placenta del ovino (100-150 días), encontrándose en mayor proporción en tejido cotiledonario y menor en amnios y corion (Cheung *et al.*, 1995), más específicamente en vellosidades citotrofoblásticas fetales y tejidos epiteliales maternos (Matsumoto *et al.*, 2002).

Como hemos mencionado anteriormente, el VEGF es un regulador de la angiogénesis, vasculogénesis y permeabilidad vascular durante la gestación en la placenta, cuya actividad es influenciada por el HIF-1, debido a cambios en la tensión de O₂ y, a partir de esto, autores como

Matsumoto *et al.* (2002) han estudiado el comportamiento que sufre el VEGF frente a hipoxia en gestación. Los resultados de estos estudios han comprobado que la localización de esta molécula en fetos sometidos a hipoxia por 4 días se mantiene en las estructuras anteriormente mencionadas, sin sufrir modificación debido a la hipoxia, pero la señal de presencia de esta molécula es mucho mayor en estos tejidos hipóxicos que lo observado en los tejidos de fetos normóxicos.

Además de los roles ya mencionados del VEGF, se ha demostrado que incrementa la expresión de la enzima eNOS en las células endoteliales, y regula la producción de óxido nítrico (NO) en las mismas (Ahmed *et al.*, 1997; Vonnahme *et al.*, 2005). El NO es sintetizado a partir de la L-arginina por la enzima NOS, de la cual hay tres isoformas: NOS neuronal (nNOS o tipo I), NOS inducible (iNOS o tipo II) y NOS endotelial (eNOS o tipo III). La nNOS y eNOS son llamadas de forma conjunta “cNOS”, por expresarse de manera “constitutiva” en muchos tejidos, mientras que la iNOS es inducida por citoquinas inflamatorias y hormonas. Ambas, cNOS e iNOS, son expresadas en la placenta de mamíferos, incluyendo humanos, cerdos y ovejas (Kwon *et al.*, 2004; Farina *et al.*, 2001).

Estudios en placenta ovina han detectado la presencia de eNOS predominantemente en células endoteliales de arterias y microvasos fetales y maternos, además en vellosidades placentarias fetales. La enzima iNOS ha sido localizada sólo en estroma de células del tejido intercotiledonario (Zheng *et al.*, 2000).

El NO es, al igual que el VEGF, un regulador clave de la angiogénesis y desarrollo placentario durante la preñez. Se ha visto que su producción conduce a un incremento en el flujo sanguíneo y se encuentra elevado durante la preñez tardía de ovejas que cursan con preñeces múltiples (Vonnahme *et al.*, 2005). Sin embargo, poco se sabe sobre la síntesis placentaria de NO asociada con desarrollo del feto en el ovino (Kwon *et al.*, 2004). Myatt *et al.* (1997) demostraron que la expresión de la enzima eNOS, y por lo tanto, la síntesis de NO, están incrementadas en la vasculatura feto-placentaria obtenida de pacientes que sufren preeclampsia, con o sin restricción de crecimiento intrauterino. Esto permite suponer que el incremento de la expresión de eNOS podría ser una respuesta adaptativa al incremento en la resistencia vascular, pobre perfusión e hipoxia, y jugaría un importante rol en la aclimatización tanto de la madre como del feto a la hipoxia crónica (Rosselli *et al.*, 1998; Xiao *et al.*, 2001). Lo mismo fue demostrado en un estudio

desarrollado por Xiao *et al.* (2001), en ovinos expuestos a hipoxia crónica de altura, en que la expresión de eNOS como proteína y producción de NO se encontraron aumentadas en arterias uterinas de ovejas preñadas.

Por otra parte, recientes descubrimientos, han demostrado la participación activa de la hormona Leptina en el desarrollo placentario y fetal. La Leptina fue identificada originalmente como una proteína derivada de los adipocitos y fue considerada por años como un regulador exclusivo de la saciedad y de la homeostasis energética. Su función en la preñez fue más tarde sugerida por descubrimientos que demostraron que los niveles plasmáticos de ésta durante la gestación eran mayores que los encontrados en individuos no grávidos y que la Leptina era sintetizada dentro de la unidad fetoplacentaria. Estudios de Schulz *et al.* (2000) identificaron la presencia de receptores de membrana para Leptina en placenta humana, más específicamente en células del sincitiotrofoblasto (Hauguel-de Mouzon *et al.*, 2006), lo que fue más tarde corroborado en ovinos, siendo localizado tanto su receptor como la hormona Leptina en la placenta de estos.

La Leptina circula en la sangre como una proteína monomérica de 16 kD (Buchbinder *et al.*, 2001; Hauguel-de Mouzon *et al.*, 2006), involucrada directamente en la adipogénesis (aumento del número de adipocitos y estroma asociado), proceso que está estrechamente relacionado con la angiogénesis durante el desarrollo de la masa adiposa. A partir de esto, se ha deducido que la Leptina es capaz de modular el desarrollo de la vasculatura y crecimiento celular. Además, al ser secretada al plasma, las células endoteliales estarían expuestas a concentraciones mucho mayores de esta citoquina que otros tipos celulares, por lo tanto, ejercería su acción vía receptores específicos ubicados en éstas células endoteliales (Bouloumie *et al.*, 1998).

Buchbinder *et al.* (2001) estudiaron la relación entre las concentraciones de Leptina en el cordón umbilical y el tamaño placentario-fetal en ovinos, encontrando que sus concentraciones estaban inversamente correlacionadas con el tamaño de la placenta y del feto y eran significativamente elevadas en fetos con restricción del crecimiento, todos los cuales provenían de un ambiente gestacional asociado con cambios significativos en la masa y vasculatura placentaria. Los estímulos responsables del incremento en la expresión de la Leptina no están del todo claros, pero la hipoxia surge como un eventual inductor de este aumento (Hauguel-de Mouzon *et al.*, 2006).

Variados son los efectos producidos en el organismo de forma directa o indirecta debido a la exposición a hipoxia hipobárica, dentro de los que se encuentra el ya señalado estado de “estrés oxidativo”. Estudios han demostrado que las ROS son participantes esenciales en procesos fisiológicos, pero el aumento de éstas, que se produce durante el estado de estrés oxidativo, tiene un rol en el desarrollo de procesos patológicos que involucran el tracto reproductivo femenino, tales como preeclampsia, abortos, embriopatías fetales y diabetes gestacional (Agarwal *et al.*, 2005). El daño oxidativo no se produce mientras haya un equilibrio entre la producción de estas ROS y la defensa antioxidante del organismo, por lo que la administración de antioxidantes podría constituir una herramienta terapéutica frente al aumento de ROS por hipoxia (Landvik *et al.*, 2002). Estudios han demostrado que la suplementación con vitaminas C y E en mujeres con alto riesgo de preeclampsia, está asociada con mejoras en algunos índices relevantes de estrés oxidativo y disfuncionalidad placentaria, alcanzando valores que son observados en mujeres sanas (Landvik *et al.*, 2002; Chappell *et al.*, 2002).

En el caso de los ovinos, Atlagich *et al.* (2007) demostraron que la suplementación de vitaminas antioxidantes en ovejas preñadas, independiente del tiempo de exposición a hipoxia hipobárica, producía un significativo incremento en el peso al nacimiento de los corderos, además de prevenir los efectos del estrés oxidativo en las características placentarias en preñeces hipóxicas.

El fundamento para el uso combinado de las vitaminas C y E en variados estudios para contrarrestar el efecto del estrés oxidativo se debe, en parte, al sinergismo entre estas dos vitaminas, que ha sido demostrado *in vitro e in vivo*. La vitamina E es lipofílica y es considerada fundamental en el control de la peroxidación lipídica durante el estrés oxidativo. La vitamina C, en tanto, es hidrófilica y se considera dentro de las más importantes líneas de defensa antioxidante del organismo en presencia de estrés oxidativo. Además, actúa regenerando la vitamina E oxidada hacia su forma reducida, así mejora el potencial de ésta para prevenir la peroxidación lipídica (Salonen *et al.*, 2000; Chappell *et al.*, 2002; Padayatty *et al.*, 2002). A partir de lo anterior se deduce que, debido a la importancia del VEGF, Leptina y la enzima NOS en el desarrollo placentario y fetal, es probable que los cambios producidos en la placenta y el feto debido a la presencia de hipoxia hipobárica ocurran por efectos directos e indirectos de la hipoxia sobre la expresión de estos factores y

hormonas. La hipótesis del presente trabajo es que la administración de vitaminas antioxidantes en gestaciones ovinas bajo hipoxia hipobárica de altura, modifica la localización y la expresión de factores de crecimiento en la placenta ovina. Para responder esta hipótesis se plantea el siguiente objetivo general: Determinar el efecto de la administración diaria de la combinación de vitaminas C y E, sobre la localización y expresión de factores de crecimiento, que regulan la angiogénesis placentaria en gestaciones ovinas desarrolladas en la altura.

Los objetivos específicos son:

- Caracterizar la expresión y localización de VEGF, eNOS, iNOS, nNOS y Leptina, en placenta de ovejas que gestaron en la altura.
- Caracterizar el efecto de la administración de vitaminas E y C sobre la expresión y localización de VEGF, las 3 isoformas de NOS y Leptina en placenta de ovejas que gestaron en altura.
- Comparar la localización y expresión de VEGF, las 3 isoformas de NOS y Leptina en la placenta, entre ovejas tratadas y no tratadas con antioxidantes.

MATERIAL Y METODO

Lugar y 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 20 ovejas criollas de segundo parto con $42,6 \pm 3,4$ kg de peso promedio, 10 de las cuales eran originarias del Valle de Lluta a menos de 700 msnm ($18^{\circ}23'08''S$, $70^{\circ}08'53''W$), ubicado en la XV Región de Arica y Parinacota. Las restantes fueron originarias de la localidad de Putre, ubicado sobre los 3550 msnm ($18^{\circ}11'48''S$, $69^{\circ}33'11''W$) a 128 kilómetros al este de Arica. Las ovejas fueron encastadas con carneros de fertilidad probada y el diagnóstico de gestación fue realizado mediante ecografía a los 16-20 días desde el encaste. Una vez confirmada la preñez, las ovejas fueron trasladadas a las instalaciones del Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS) de la Universidad de Chile en la localidad de Putre, donde cursaron la totalidad de su preñez hasta el día de la toma de muestras. Fueron separadas en 4 grupos con un $n=5$ cada uno. El primer grupo estuvo compuesto por animales originarios de Putre (HH) y fue alimenta-

do diariamente con 2 kg de heno de alfalfa por animal, lo que satisface los requerimientos determinados por el NRC (National Research Council) para una oveja cursando el último tercio de gestación, dividido en dos raciones durante el día, y agua a libre disposición. El segundo grupo de animales originarios del Valle de Lluta (LH) fue mantenido bajo las mismas condiciones alimenticias y de manejo que el grupo HH. Los dos grupos restantes HHV y LHV correspondieron respectivamente a los mismos grupos anteriores, pero se les suplementó diariamente y durante todo el período gestacional con 500 mg de vitamina C y 350 UI de vitamina E por día, administradas junto con el alimento.

Procedimiento de obtención de muestras:

A los 100 días de gestación se realizó el proceso de obtención de muestras en las dependencias del INCAS. Para esto, los animales fueron anestesiados profundamente con tiopental sódico en dosis de 20 mg/kg EV. Posteriormente se realizó una laparotomía media infraumbilical para poder abordar el útero. Se extrajo una muestra sanguínea de 1 mL de arteria uterina y luego de escindir el útero también se obtuvo una muestra de sangre de la arteria y vena umbilical, en las cuales fueron medidas las variables PO_2 (Presión parcial de oxígeno), PCO_2 (Presión parcial de dióxido de carbono), Ht (hematocrito), Hb (hemoglobina), SatHb (saturación de Hb por O_2) y pH, utilizando un analizador de gases de IL Synthesis 25TM (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, U.S.A.). Además se obtuvieron 3 mL de sangre de cada vaso para la medición de la concentración plasmática de vitaminas.

Posteriormente, se procedió a realizar la instalación de catéteres en la arteria uterina y vasos umbilicales, luego del sacrificio del feto y de la madre con sobredosis del anestésico. Se ligó el cordón umbilical distalmente a la instalación del catéter umbilical para luego extraer el feto y pesarlo. A través de los catéteres se procedió a la perfusión de la placenta de la oveja *in situ*, primeramente con 4 L de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4, proceso que permite que la estructura placentaria pierda el contenido sanguíneo y las muestras se obtengan limpias. Esto fue seguido por la perfusión de 4 L de Paraformaldehído al 4% en tampón fosfato, para lograr la fijación de las muestras. Una vez que finalizó este proceso, se procedió a la extracción de la totalidad de los placentomas ya limpios y fijados. Estos fueron pesados en conjunto y medidos individualmente por

su diámetro mayor y menor para obtener una estimación de la superficie promedio. Tres placentomas del tipo A (el más representativo de la placenta ovina) (Penninga y Longo, 1998), fueron separados y divididos en mitades para su posterior utilización en el estudio.

Inmunohistoquímica para la expresión de VEGF, eNOS, iNOS, nNOS y Leptina:

Luego de una posfijación de 12 horas, las muestras de placentomas fueron pasadas a tampón fosfato para ser trasladadas al laboratorio de Fisiología del Departamento de Ciencias Biológicas Animales de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile, siendo incluidas posteriormente en parafina, para obtener cortes transversales de 5 μm , que fueron montados en portaobjetos para su posterior análisis, mediante la técnica de Inmunohistoquímica.

De cada placentoma se obtuvieron 3 cortes transversales de la zona media para estudiar cada una de las moléculas de interés (VEGF, eNOS y Leptina). Los cortes fueron desparafinados y rehidratados mediante tres pasos de 10 minutos por Xilol al 100% y tres pasos de 5 minutos por Etanol al 100%-90%-70% para finalizar con agua destilada. Se realizó una recuperación de antígenos pretratando los cortes con tampón Citrato 10 mM pH 6,0 por 10 minutos a 95°C. La peroxidasa endógena fue bloqueada con peróxido de hidrógeno al 3% por 10 minutos, para luego proceder al bloqueo de los sitios inespecíficos con una solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 2% por 15 minutos.

La inmunolocalización de VEGF fue realizada siguiendo la técnica descrita por Yee *et al.* (2003), con un anticuerpo primario policlonal IgG purificado de conejo (Santa Cruz Biotechnology, USA, VEGF A-20: sc-152) en dilución de 1:200 en PBS, conteniendo 1% de BSA, técnica probada previamente en la especie ovina. Para la isoforma eNOS, la técnica realizada fue la descrita por Zheng *et al.* (2000), utilizando un anticuerpo monoclonal purificado (BD Biosciences, USA, NOS Type III cód. 610297) en dilución de 1:200; para la iNOS el anticuerpo policlonal purificado de conejo (Santa Cruz Biotechnology, USA, NOS2 N-20: sc-651) en dilución de 1:200, para la nNOS el anticuerpo monoclonal purificado de ratón IgG2a (BD Biosciences, USA, NOS Type I cód. 610309) en dilución de 1:1000. Se utilizaron anticuerpos de origen humano, con probada inmunoreactividad en ovinos (Zheng *et al.*, 2000; Yee *et al.* 2003). Finalmente, para la detección de la hormona Lepti-

na fue usado el anticuerpo policlonal purificado de conejo (Santa Cruz Biotechnology, USA, Ob A-20: sc-842) en dilución de 1:200. Los cortes de placenta fueron incubados durante toda la noche a temperatura ambiente, con cada uno de los anticuerpos. Los controles fueron mantenidos durante este mismo lapso en la solución de PBS, en ausencia del anticuerpo primario. A continuación se realizó una incubación con el anticuerpo secundario, en una dilución de 1:200 en PBS por 90 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario utilizado para VEGF, iNOS y Leptina fue biotinilado de Cabra anti-IgG-b de Conejo y para eNOS fue de Cabra anti-IgG-b de Ratón (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Las muestras fueron incubadas con estreptavidina por 60 minutos, para luego proceder al revelado con el cromógeno DAB (diaminobenzidina) por aproximadamente 15 minutos. Finalmente, los cortes ya procesados fueron fotografiados mediante un sistema de captura y análisis de imágenes acoplado a un microscopio óptico con un aumento de 400 x. Se fotografiaron un total de 10 campos por corte, conteniendo tejido placentario materno y fetal, para luego realizar una semicuantificación de la expresión de los factores de crecimiento mediante el estudio de la densidad relativa de la expresión de cada uno de ellos. Para esto se utilizó el programa "Image J" (NIH, programa a libre disposición). Además se realizó un estudio de la vascularización placentaria, mediante la observación de cortes transversales alternados de placentoma teñidos con hematoxilina-eosina, en los que se midieron las áreas ocupadas por lechos vasculares como porcentaje del área total ocupada por tejido placentario, el diámetro de los cortes transversales de estos vasos y el número total de estos.

Análisis estadístico:

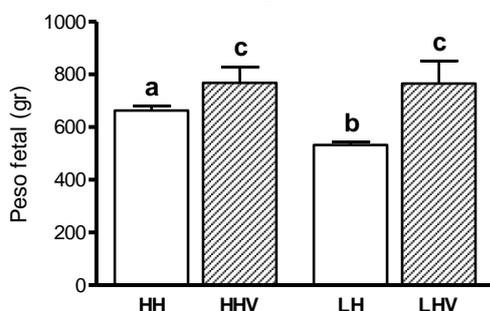
Los resultados fueron analizados mediante un ANDEVA (Análisis de Varianza), considerando el "origen" de los animales y "tratamiento" con vitaminas como factores fijos y la interacción de ambos. Además se realizaron correlaciones de Pearson entre todas las variables. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$. Cuando el ANDEVA resultó significativo se realizaron comparaciones de medias para identificar los grupos distintos. Los resultados son expresados como $X \pm D.E.$

RESULTADOS

“Efecto de la exposición de larga y corta duración a la hipoxia hipobárica y de la terapia antioxidante sobre las características macroscópicas placentarias y fetales”:

Como se observa en la figura 3, el peso fetal a los 100 días de gestación fue significativamente menor en los animales con corta exposición a la hipoxia (LH), con valores de $531,7 \pm 11,6$ g, en relación a los animales adaptados a la altura (HH) con valores de $663,3 \pm 16,1$ g, tal como se observa en la figura 3. La terapia antioxidante tuvo un efecto en ambos grupos aumentando el peso fetal, logrando valores de $767,5 \pm 60,1$ g y $765,0 \pm 86,5$ g para los grupos HHV y LHV respectivamente. El peso fetal presentó una correlación significativa ($r=0,54$, $p<0,05$) con el número de placentomas por animal.

Fig. 3:
Efecto de la hipoxia hipobárica de altura y terapia antioxidante sobre el Peso Fetal a los 100 días de gestación:



Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos ($P \leq 0,05$).

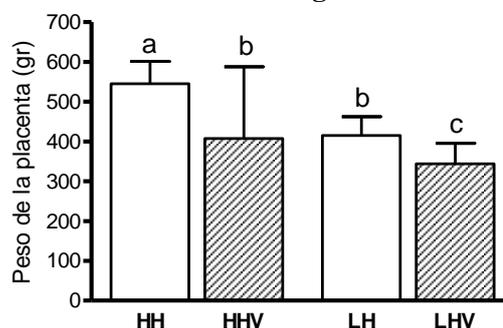
El peso de la placenta fue mayor en el grupo HH ($545 \pm 56,3$ g), seguido por el grupo LH ($531,75 \pm 11,61$ g), como se observa en la figura 4. En ambos grupos suplementados con vitaminas (HHV y LHV) se observó una disminución de los pesos placentarios, obteniendo valores de $407,5 \pm 180,3$ g y $343,8 \pm 51,5$ g, respectivamente.

El grupo HH presentó el menor número de placentomas por animal ($54,6 \pm 3,5$), pero sin diferencias significativas con el grupo LH ($60,0 \pm 13,3$). En cambio, la terapia antioxidante produjo cambios significativos en los dos grupos suplementados, aumentando el número de placentomas en ambos grupos, obteniendo valores de $72,5 \pm 12$ para HHV y $70,6 \pm 5,8$ para LHV. Estos resultados están representados en la figura 5.

Para la característica superficie del placentoma no se observaron diferencias significativas entre

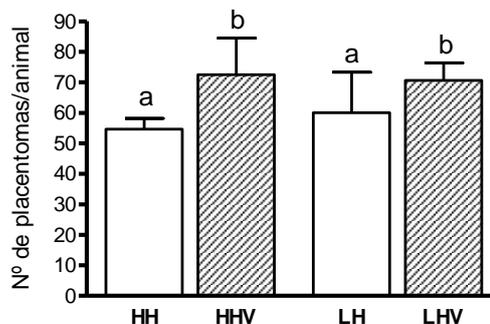
animales adaptados y no adaptados a la altura. Si se observó un aumento de esta superficie al ser suplementados con vitaminas, sin ser estos cambios significativos (figura 6).

Fig. 4:
Efecto de la hipoxia hipobárica de altura y terapia antioxidante sobre el Peso de la Placenta a los 100 días de gestación:



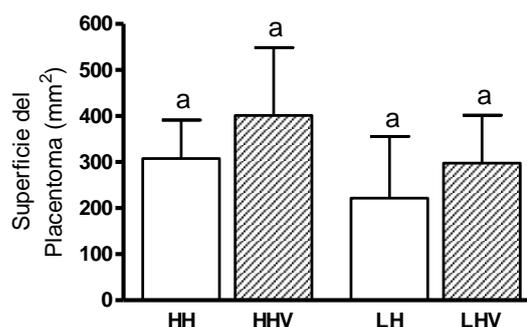
Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos ($P \leq 0,05$).

Fig. 5:
Efecto de la hipoxia hipobárica de altura y terapia antioxidante sobre el Número de Placentomas por animal a los 100 días de gestación:



Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos ($P \leq 0,05$).

Fig. 6:
Efecto de la hipoxia hipobárica de altura y terapia antioxidante sobre la superficie total de cada placentoma a los 100 días de gestación:



Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos ($P \leq 0,05$).

Tabla 1: Correlaciones significativas entre características fetales y placentarias.

CARACTERISTICAS ANALIZADAS	CORRELACIONES
SVF por placentoma / Área prom. de cada sección vascular F	r= 0,68, p≤ 0,01
SVM por placentoma / Área prom. de cada sección vascular M.	r= 0,61, p≤ 0,01
Peso Fetal / N° de placentomas	r= 0,54, p≤ 0,05
SVF por placentoma / N° secciones vasculares F	r= 0,25, p≤ 0,01
SVM por placentoma / N° secciones vasculares M	r= 0,21, p≤ 0,01
Peso Fetal / Área prom. de cada sección vascular M.	r= -0,79, p≤ 0,01
Peso Fetal / SVM por placentoma	r= -0,68, p≤ 0,01
Área prom. de cada sección vascular M / N° secciones vasculares M.	r= -0,68, p≤ 0,01
N° de placentomas / Área prom. de cada sección vascular M.	r= -0,52, p≤ 0,05
Área prom. de cada sección vascular F / N° secciones vasculares F.	r= -0,45, p≤ 0,01

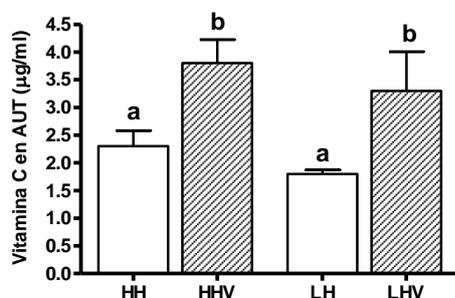
SVM: Superficie vascular placentaria materna; SVF: Superficie vascular placentaria fetal.

La tabla n° 1 resume las correlaciones significativas encontradas entre las distintas características fetales y placentarias analizadas, considerando correlaciones significativas cuando $p \leq 0,05$.

Concentración plasmática de Vitaminas C y E a los 100 días de gestación:

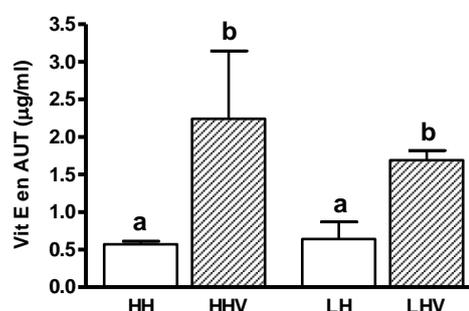
Los resultados muestran efectos significativos de la administración de vitaminas sobre sus concentraciones sanguíneas, registrándose un aumento de éstas en los animales suplementados (HHV y LHV), tal como se observa en las figuras 7 y 8.

Fig. 7:
Efecto de la hipoxia hipobárica de altura y terapia antioxidante sobre las concentraciones sanguíneas de vitamina C:



Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos ($P \leq 0,05$).

Fig. 8:
Efecto de la hipoxia hipobárica de altura y terapia antioxidante sobre las concentraciones sanguíneas de vitamina E:



Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos ($P \leq 0,05$).

Gases sanguíneos en Arteria Uterina (AUT) a los 100 días de gestación:

La medición de los gases sanguíneos en la AUT está resumida en la tabla n° 2. Se evidencia un estado hipoxémico claro en los 4 grupos analizados y un aumento significativo de la PaO_2 en los grupos suplementados con vitaminas. El grupo LH fue el que presentó la menor PaO_2 , presentando diferencias significativas con el grupo HH. La $PaCO_2$ mostró un aumento no significativo en los animales suplementados con vitaminas. El hematocrito (Ht) fue menor en los animales suplementados.

Tabla 2: Gases sanguíneos medidos en Arteria Uterina (AUT) a los 100 días de gestación.

Grupo	PaO ₂ AUT (mmHg)	PaCO ₂ AUT (mmHg)	Ht AUT (%)	Hb AUT (mg/dL)	SatHb AUT (%)	pH AUT
HH	58±1 ^a	23,8±0,8	38,5±0,7 ^b	13,4±1	82,3±1,1	7,434±0,01 ^a
HHV	62,5±0,7 ^b	26,9±0,1	32,5±2,65 ^a	11,13±0,1	85,6±3,1	7,497±0,00 ^b
LH	46,5±0,7 ^c	18,8±2,8	40,3±0,7 ^c	13,7±1,4	75,4±1	7,38±0,1 ^a
LHV	55,3±5,5 ^d	25,8±5,3	38,5±0,7 ^b	13,05±1	80,6±1,6	7,39±0,04 ^a

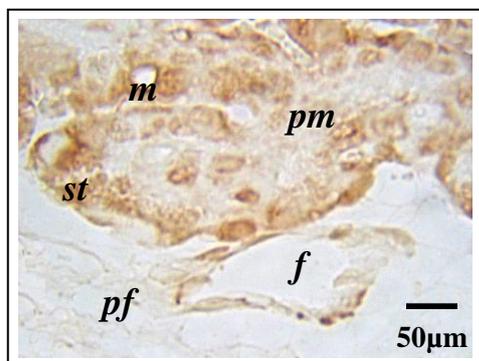
Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos (P≤0,05). PaO₂: Presión parcial de O₂; PaCO₂: Presión parcial de CO₂; Hb: Hemoglobina; SatHb: Saturación de Hb; Ht: Hematocrito.

La hemoglobina (Hb) fue mayor en HH y LH. La saturación de Hb (SatHb) fue mayor en los animales suplementados. El pH presentó un aumento significativo para el grupo adaptado a la hipoxia luego de recibir terapia antioxidante, no siendo significativo este cambio para el grupo LH.

Expresión del Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF) en la placenta ovina:

Los resultados de la inmunohistoquímica mostraron la presencia de VEGF en los placentomas de todos los individuos analizados. La localización de VEGF se presentó de igual forma en todos los grupos analizados. Esta coincide con estructuras placentarias ocupadas por células citotrofoblásticas de las vellosidades fetales y casi en igual intensidad en células epiteliales maternas que se encuentran contiguas a dichas vellosidades.

Fig. 9:
Corte de placenta representativo de la reacción Inmunohistoquímica para VEGF:

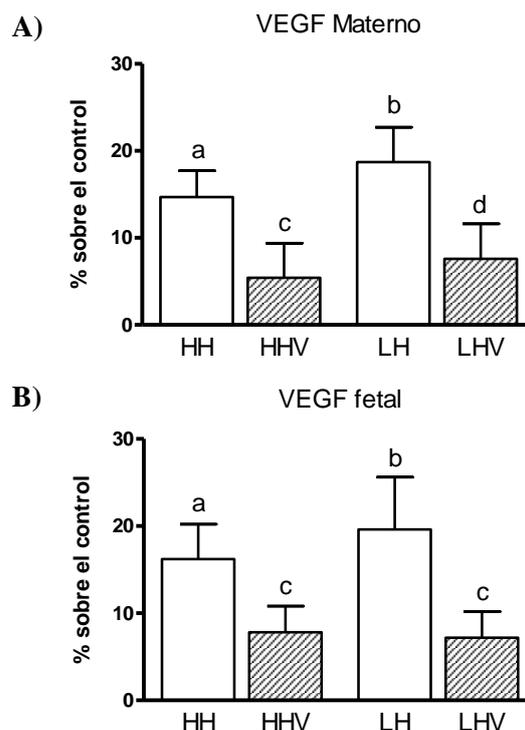


“f”: Vaso fetal; “m”: Vaso materno; “st”: Trofoblasto; “pm”: Placenta materna; “pf”: Placenta fetal. Aumento de 400 x.

Se observa además una tinción leve en las células vecinas a este sincitiotrofoblasto y en las células endoteliales de vasos sanguíneos tanto feta-

les como maternos, por lo que la distribución del VEGF podría ser descrita como levemente difusa en tejidos del sincitiotrofoblasto placentario (figura 9). El grupo de ovejas de corta exposición a la hipoxia que no fueron suplementadas con vitaminas diariamente en su dieta (LH) fue el que presentó la mayor intensidad de tinción, por lo tanto, es en el que fue observada la mayor expresión del factor tal como se muestra en la figuras 10 A y B.

Fig. 10:
Efecto de la hipoxia hipobárica de altura y terapia antioxidante sobre la expresión del VEGF en placenta materna (A) y fetal (B):



Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos (P≤0,05). Expresión de VEGF expresada en proporción (%) sobre el control (definido como una placa con ausencia de VEGF).

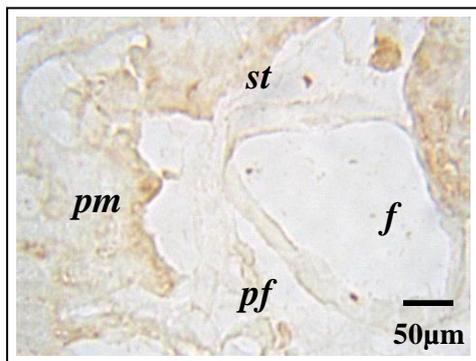
Los animales que mostraron la menor expresión del factor fueron los pertenecientes a ambos grupos suplementados con vitaminas. La localización no sufrió modificaciones debido a la terapia antioxidante, manteniéndose distribuido en las vellosidades trofoblásticas fetales, epitelio materno y, en menor proporción, en las células endoteliales de los vasos maternos y fetales.

Expresión de Leptina en la placenta ovina a los 100 días de gestación:

La hormona Leptina fué detectada en todas las muestras analizadas mediante inmunohistoquímica. Su localización está más bien limitada a la zona del sinciotrofoblasto, considerando las células de las vellosidades citotrofoblásticas fetales y epiteliales maternas. No se observó tinción al resto del tejido placentario materno y solo se evidencia presencia leve de la hormona en células endoteliales de vasos fetales y maternos (figura 11).

Fig. 11:

Corte de placenta representativo de la reacción Inmunohistoquímica para Leptina:



“f”: Vaso fetal; “m”: Vaso materno; “st”: Trofoblasto; “pm”: Placenta materna; “pf”: Placenta fetal. Aumento de 400 x.

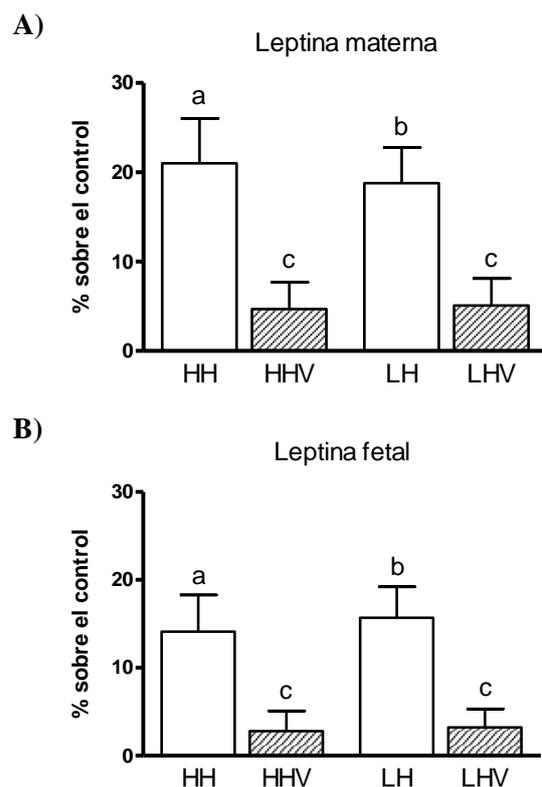
Cabe destacar que la expresión de la Leptina fué cerca de un 22% mayor en la placenta materna versus la placenta fetal, considerando un promedio de las medias de los cuatro grupos (HH, LH, HHV, LHV). En el caso de la placenta materna los grupos HH y LH mostraron la mayor expresión de la hormona Leptina, presentando amplias diferencias en relación a los grupos suplementados HHV y LHV (figuras 12A y B). En este caso las ovejas del grupo HH presentaron mayor expresión de la hormona que las pertenecientes al grupo LH ($p \leq 0,05$).

En cuanto a la placenta fetal, esta mostró mayor expresión en los individuos pertenecientes al grupo LH, seguido de aquellas del grupo HH, mostrando nuevamente diferencias significativas entre estos grupos.

Los grupos suplementados HHV y LHV, al igual que ocurrió con la placenta materna, mostraron niveles de expresión de la hormona muy por debajo de aquellos logrados en los grupos no suplementados.

Fig. 12:

Efecto de la hipoxia hipobárica de altura y terapia antioxidante sobre la expresión de la hormona Leptina en placenta materna (A) y fetal (B):



Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos ($p \leq 0,05$). Expresión de la hormona Leptina expresada en proporción (%) sobre el control (definido por una placa con ausencia de 1er Anticuerpo Antileptina).

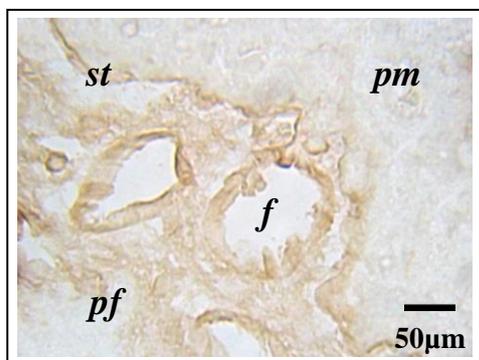
Expresión de las isoformas de NOS en la placenta ovina a los 100 días de gestación:

eNOS:

La eNOS fué detectada tanto en placenta materna como fetal. La localización mantiene un patrón similar al encontrado para VEGF y Leptina,

correspondiente al sinciotrofoblasto, descrita como zona de producción y secreción de hormonas y factores de crecimiento fetales. Además, se observa una clara tinción en el endotelio de vasos fetales, y una tinción más leve en los vasos maternos (figura 13).

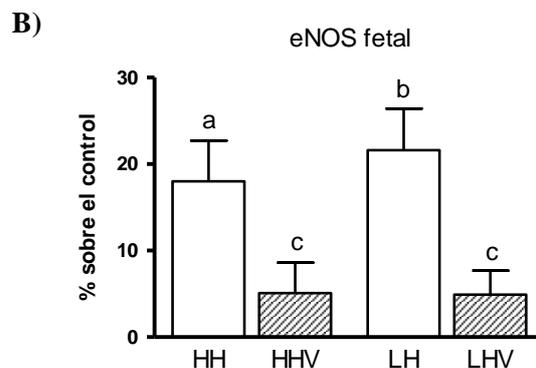
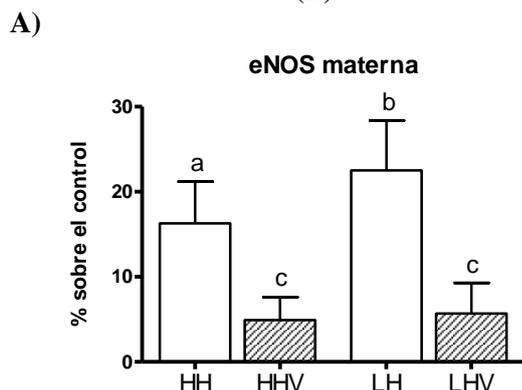
Fig. 13:
Corte de placenta representativo de la reacción
Inmunohistoquímica para eNOS:



“f”: Vaso fetal; “m”: Vaso materno; “st”: Trofoblasto; “pm”: Placenta materna; “pf”: Placenta fetal. Aumento de 400 x.

El grupo LH fué el que presentó la mayor expresión de eNOS tanto en placenta materna como fetal, siendo seguido por el grupo HH, pero presentando diferencias significativas entre ellos ($p \leq 0,05$). En cuanto a los grupos que fueron suplementados con vitaminas C y E, LHV y HHV, ambos presentaron una expresión de eNOS más baja que la mostrada por los grupos LH y HH, pero sin presentar diferencia significativa entre ellos (figuras 14A y B).

Fig. 14:
Efecto de la hipoxia hipobárica de altura y
terapia antioxidante sobre la expresión de la
enzima eNOS en placenta materna (A) y fetal
(B):



Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos ($p \leq 0,05$). Expresión de la enzima eNOS expresada en proporción (%) sobre el control (definido por una placa con ausencia de 1er Anticuerpo AntieNOS).

Al realizar una correlación entre las concentraciones sanguíneas de vitaminas C y E con la expresión de los factores de crecimiento y hormonas, vemos que existe una correlación directa negativa muy alta entre estas (tabla 3), ya que en los animales suplementados, donde fueron medidas las mayores concentraciones de vitaminas C y E, fue donde se detectó la menor expresión de VEGF, Leptina y eNOS.

Tabla 3: Correlaciones significativas entre los “factores de crecimiento” y concentraciones plasmáticas de vitaminas C y E.

	Vit C AUT	Vit E AUT
VEGF Materno	r= -0,86 p ≤ 0,01	r= -0,93 p ≤ 0,01
VEGF Fetal	r= -0,80 p ≤ 0,01	r= -0,86 p ≤ 0,01
eNOS Materno	r= -0,75 p ≤ 0,05	r= -0,74 p ≤ 0,05
eNOS Fetal	r= -0,87 p ≤ 0,01	r= -0,83 p ≤ 0,01
Leptina Materna	r= -0,75 p ≤ 0,01	r= -0,93 p ≤ 0,01
Leptina Fetal	r= -0,83 p ≤ 0,01	r= -0,90 p ≤ 0,01

N/S: Correlación No Significativa; “p”: nivel de significación; “r”: Porcentaje de Correlación.

iNOS y nNOS:

Nuestros resultados para las isoformas de iNOS y nNOS fueron negativos, ya que ambas moléculas no fueron encontradas en los placentomas analizados mediante la técnica de inmunohistoquímica.

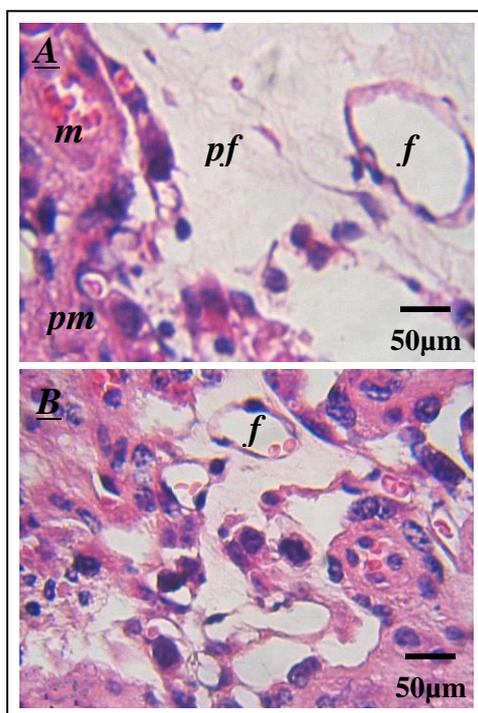
mica. Cabe destacar que el estudio fue realizado con variadas repeticiones de la técnica, utilizando reactivos de efectividad comprobada en estudios anteriores realizados por otros autores. El anticuerpo utilizado fue probado con distintas concentraciones llegando a la de 1:50, por lo que la ausencia de tinción para estas moléculas puede ser atribuida a que sus concentraciones en los tejidos analizados eran muy bajas para ser detectadas mediante esta técnica, o a la ausencia de ellas.

Área vascular en placenta materna y fetal a los 100 días de gestación:

Las mediciones de los vasos sanguíneos maternos y fetales fueron realizadas en muestras de placenta materna y fetal teñidas con Hematoxilina-Eosina, tal como se muestra en la figuras 15 A y B.

Fig. 15:

Placenta ovina teñida con Hematoxilina-Eosina para la visualización y medición de vasos sanguíneos maternos y fetales.



Aumento de 400X. “f”: Vaso fetal; “m”: Vaso materno; “st”: Trofoblasto; “pm”: Placenta materna; “pf”: Placenta fetal. Aumento de 400 x.

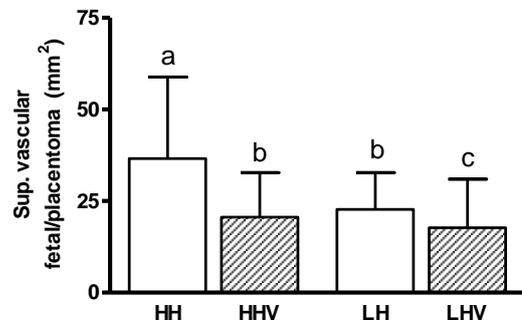
Tanto para la placenta materna como para la fetal, el área vascular mostró diferencias significativas entre los animales adaptados a la hipoxia (HH) versus los de corta exposición a esta (LH). En los grupos que recibieron terapia

antioxidante se observó una reducción significativa del área ocupada por vasculatura, tanto en placenta materna como fetal, tal como se observa en la figuras 16 A y B.

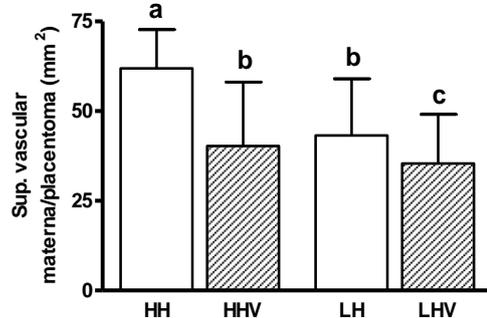
Fig. 16:

Efecto de la hipoxia hipobárica de altura y terapia antioxidante sobre la superficie vascular de la placenta fetal (A) y materna (B):

A)



B)



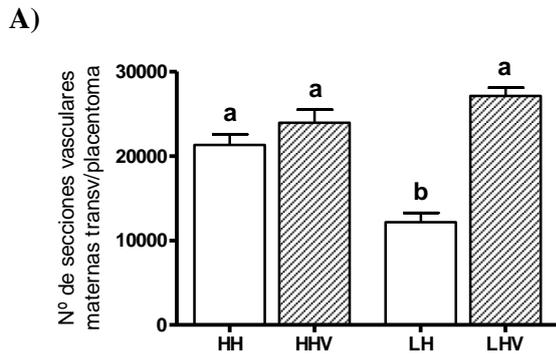
Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos ($p \leq 0,05$).

Al analizar el número de secciones vasculares transversales por placentoma se observó un menor número de secciones vasculares en los animales adaptados a la hipoxia HH (figuras 17A y B). La terapia antioxidante logró un cambio significativo en esta característica aumentando el número de secciones vasculares en ambos grupos suplementados con vitaminas.

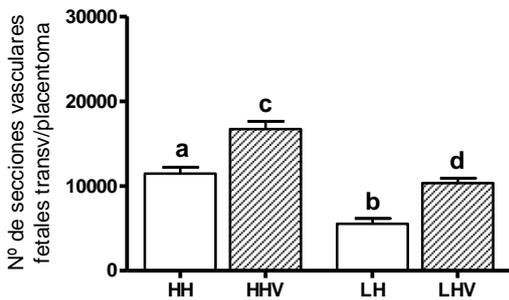
El área promedio de cada sección vascular presentó resultados concordantes con los mostrados para el área vascular total, mostrando secciones vasculares de mayor tamaño para el grupo de larga exposición a la hipoxia (adaptado) en el caso de la placenta fetal. Los animales suplementados de ambos grupos presentaron una reducción significativa en el área promedio de cada sección vascular en la placenta materna y fetal (figuras 18A y B).

Fig. 17:

Efecto de la hipoxia hipobárica de altura y terapia antioxidante sobre el n° de vasos por placentoma, en placenta fetal (A) y materna (B):



B)

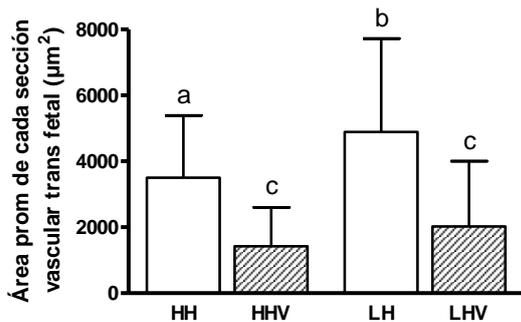


Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos ($p \leq 0,05$).

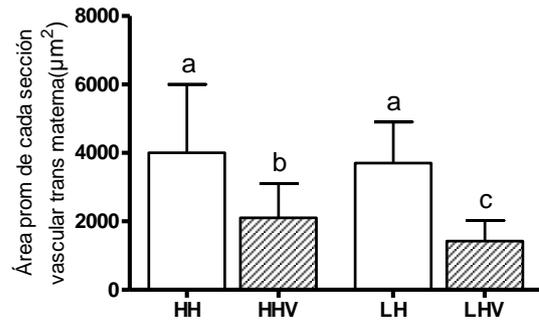
Fig. 18:

Efecto de la hipoxia hipobárica de altura y terapia antioxidante sobre el área transversal de vasos fetales (A) y maternos (B):

A)



B)



Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos ($p \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

Este estudio demostró un importante efecto de la suplementación vitamínica antioxidante en individuos que están bajo el efecto de la hipoxia hipobárica, logrando revertir muchas de las consecuencias negativas que afectan la reproducción de rebaños de altura, producidas por la baja de la presión de oxígeno a la cual se enfrentan, consecuencias que son perjudiciales para la producción animal bajo estas condiciones.

Autores como Jacobs *et al.* (1988) y Penninga y Longo (1998), han estudiado el efecto de la hipoxia hipobárica sobre características como crecimiento fetal y placentario en ovinos, en contraste con el desarrollo normal que ocurre en estos animales al nivel del mar. Sin embargo, los estudios que comparan distintos grados de exposición a la hipoxia están descritos básicamente en humanos (Beall *et al.*, 2007; Gonzales, 2007).

Las diferencias en el peso fetal y estructuras placentarias entre animales normóxicos e hipóxicos se vuelven particularmente evidentes en preñez avanzada (Jacobs *et al.*, 1988), sugiriendo que la limitación en los niveles de oxígeno influye mucho más al final de la gestación, donde la masa fetal está incrementando rápidamente. Esto puede relacionarse al proceso angiogénico y desarrollo placentario, en el cual el área de densidad capilar en carúncula materna y cotiledón fetal crecen exponencialmente desde el día 50 hasta el 140 de gestación en ovinos, siendo el desarrollo previo a los 50 días más bien lento y constante (Reynolds *et al.*, 2005). En relación a esto, podríamos suponer que los efectos más notorios de la exposición a hipoxia hipobárica sobre la placenta y el desarrollo vascular deberían evidenciarse en preñez avanzada, debido a su crecimiento exponencial en este período.

En nuestro estudio el peso fetal a los 100 días de gestación mostró una diferencia entre los animales de corta exposición a la hipoxia LH y aquellos adaptados a la altura HH, siendo significativamente menor en el primer grupo, o aquellos menos adaptados a la altura. En contraste, Penninga y Longo (1998) en un estudio realizado con ovejas sometidas a hipoxia hipobárica a una altura equivalente a los 3820 msnm, durante 110 días hasta completar los 140 días de gestación, no obtuvieron diferencias significativas en el peso fetal entre los fetos hipoxémicos y los normóxicos. Jacobs *et al.* (1988) reportó una disminución de cerca del 20% en el peso fetal en fetos expuestos a hipoxia hipobárica, versus aquellos gestados y nacidos a nivel del mar, en un estudio en que expuso a ovejas preñadas a una altura equivalente a los 4000 m durante 30 días hasta completar los 135 días de gestación, al igual que Parraguez *et al.* (2005) que reportó fetos nacidos en altura (3589 msnm) un 26-29% más livianos al nacimiento que aquellos nacidos al nivel del mar.

Las diferencias observadas pueden ser explicadas por variaciones en la severidad y duración de la exposición a hipoxia, así como por la edad gestacional. Sin embargo, esto no ayuda a explicar las diferencias encontradas entre nuestro estudio y el desarrollado por Penninga y Longo (1998), debido a que las condiciones de hipoxia hipobárica bajo las que fueron mantenidas las ovejas son similares a las utilizadas en este estudio, no así la edad gestacional a la que fueron obtenidas las muestras. Además, nuestro estudio considera el sometimiento a hipoxia de ovejas que no tienen adaptación a la vida en altura versus aquellas que sí son adaptadas, en contraste a los estudios anteriores cuyos controles son ovejas que cursaron su gestación a nivel del mar.

En humanos, a pesar de que no hay estudios que describan un efecto agudo de la hipoxia sobre los pesos al nacimiento, se ha descrito una baja menos pronunciada en el peso al nacimiento en poblaciones que han vivido por un gran número de generaciones en altura (Moore *et al.*, 2001). Esto aparentemente sería resultado de una estrategia adaptativa observada en estas poblaciones, como lo ocurrido con los habitantes de los Andes peruanos con 12.000 años de antigüedad, o en poblaciones Tíbetanas (Beall *et al.*, 2007; Gonzales, 2007). Por lo tanto, las ovejas pertenecientes al grupo HH podrían presentar un desarrollo emergente de adaptación generacional que permita atenuar en cierto modo el efecto de la altura sobre las características fetales y placentarias.

Los grupos que recibieron la suplementación con vitaminas antioxidantes mostraron un aumento del 30% en el peso fetal para el grupo LHV y un 14% para el grupo HHV, lo que es concordante con estudios realizados por Atlagich *et al.* (2007) en que la suplementación vitamínica produjo mejoras notorias en el peso fetal al nacimiento en ovinos sometidos a hipoxia hipobárica. En estudios anteriores (Parraguez *et al.*, 2006) se ha demostrado que el sometimiento a hipoxia hipobárica produce cambios severos en variadas características placentarias como aumento del peso de placenta, tamaño de los cotiledones, superficie vascular y disminución del número de cotiledones por placenta. En nuestro estudio pudimos observar que el peso de la placenta, en los grupos que fueron suplementados con antioxidantes mostró una baja del 25% en el grupo HHV y del 35% para el grupo LHV, siendo el grupo HH el que presentó el mayor peso de la placenta. Se obtuvo también un resultado significativo en el número de placentomas. Observamos que los grupos suplementados aumentaron su número de placentomas por placenta, logrando un alza del 24% para el grupo HHV y del 15% para el grupo LHV. Por lo tanto, lo observado en los grupos más afectados por la hipoxia, o no suplementados (HH y LH), es concordante con lo descrito en el estudio realizado por Parraguez *et al.* (2006), no así con lo reportado por Penninga y Longo (1998), quien no evidencia diferencias en peso de la placenta ni en número de placentomas para los distintos grupos.

El grupo que presentó la mayor área vascular medida por placentoma fue el HH, logrando una disminución significativa de ésta en ambos grupos suplementados HHV y LHV.

Lo mismo sucedió al medir el área o sección transversal de los vasos, mostrando los grupos no suplementados vasos más grandes que aquellos que recibieron terapia antioxidante. Pero si comparamos con el número de secciones vasculares transversales observamos que ocurre lo contrario, siendo los grupos HH y LH los que presentan menor número de vasos. Considerando ambos cambios, evidenciamos que los grupos más afectados por la hipoxia hipobárica (HH y LH) presentaron una mayor área vascular total, debido a un aumento del tamaño de los vasos sanguíneos aún cuando disminuyeron en número. Cambios como estos se han reportado en la conformación de vasos en la placenta ovina de preñeces tardías sometidas a hipoxia crónica, demostrando que en la placenta fetal, los cortes transversales de vasos eran un 22% menos en número y un 31% más grandes en área luminal, siendo similar a lo ocurrido con vasos maternos,

aunque estos aumentaron un 10% en número (Krebs *et al.*, 1997; Penninga y Longo 1998; Reynolds *et al.*, 2005). En humanos, la arquitectura microvascular de la placenta fetal también sufre cambios compensatorios a la hipoxia hipobárica, incluyendo un incremento en las ramificaciones de capilares, asociado a una mayor densidad de área capilar (Mayhew *et al.*, 2004).

Los procesos de angiogénesis y vasculogénesis son mediados por varias hormonas y factores de crecimiento, tanto en humanos como en animales (Bogic *et al.*, 2000; Cheung *et al.*, 1995; Cheung y Brace, 1998; Reynolds 2005; Zamudio 2003; Zygumt *et al.*, 2003). Es así como niveles medidos en plasma de factores de crecimiento como el VEGF, aumentan a medida que la gestación avanza, coincidentemente con el aumento del desarrollo vascular (Reynolds 2005; Zygumt *et al.*, 2003). En presencia de hipoxia hipobárica, los niveles de VEGF en plasma de mujeres que cursan su gestación en altura también se ven aumentados en relación a sus controles normóxicas (Reynolds *et al.*, 2005), en conjunto con el aumento crónico de la angiogénesis, lo que hace suponer que el aumento del desarrollo vascular en presencia de hipoxia hipobárica crónica se debe a una estimulación constante en la expresión de factores de crecimiento como el VEGF. Esta estimulación ocurre a través de un proceso transcripcional, anteriormente descrito, mediado por el factor inducible por la hipoxia (HIF-1), por lo tanto, en este caso la hipoxia hipobárica actuaría como un factor inductor directo del desarrollo vascular en los animales que cursaron su gestación en altura, debido al efecto que ejerce sobre la expresión de factores de crecimiento como el VEGF, Leptina y eNOS.

Los resultados de este estudio definieron como sitio común de expresión en la placenta ovina tanto para VEGF, Leptina y eNOS, la zona ocupada por células citotrofoblásticas de las vellosidades fetales y células epiteliales maternas, zona en que se produce la interdigitación o unión de la placenta fetal y materna en la unidad definida como placentoma. La localización observada coincide con la descrita en estudios anteriores, en que fueron observados estos factores a la edad gestacional de 62, 102 y 142 días, describiendo mayor expresión placentaria en preñez avanzada (Bogic *et al.*, 2000; Cheung y Brace, 1998; Matsumoto *et al.*, 2002). Además, se describe al sincitiotrofoblasto como zona de producción y secreción de hormonas y factores de crecimiento fetales (Zheng *et al.*, 2000).

Para las 3 moléculas (VEGF, eNOS y Leptina), el grupo que presentó la mayor expresión en placenta

fué el LH, seguido por el HH, conformados ambos por lo animales más afectados por la hipoxia de altura (Matsumoto *et al.*, 2002). Esta expresión fué significativamente menor en ambos grupos suplementados con antioxidantes HHV y LHV. A partir de estos resultados podemos especular que la mayor expresión de estos factores de crecimiento en la placenta de los animales pertenecientes a los grupos HH y LH podría deberse a una mayor estimulación de estos factores, debido a un aumento de la subunidad HIF-1 α , que como explicamos anteriormente no son hidroxiladas por estar en condiciones de baja presión de oxígeno y son trasladadas al núcleo produciendo aquí la estimulación de genes encargados de regular el desarrollo de la placenta (Fryer y Simon, 2006; Moore *et al.*, 2004). El aumento de estos factores de crecimiento podría estimular un sobrecrecimiento vascular en respuesta compensatoria a la hipoxia y produciendo consigo los cambios observados en placenta y por ende en feto.

La localización observada en placenta para estos factores de crecimiento no sufrió modificaciones si comparamos los grupos no suplementados con aquellos que si recibieron terapia antioxidante, por lo tanto, la hipoxia no modificaría la localización si no que la expresión de estas moléculas (Matsumoto *et al.*, 2002).

Las moléculas iNOS y nNOS no se detectaron en la placenta. Autores como Zheng *et al.* (2000) describieron expresión de iNOS en placenta intercotiledonaria de ovejas cursando preñeces normóxicas, analizadas a los 110, 120, 130 y 142 días de gestación, no así en tejido cotiledonario ni en endotelio de vasos sanguíneos. Kwon *et al.* (2004) describió la presencia de actividad de iNOS y cNOS (eNOS y nNOS) tanto en placenta intercotiledonaria como en placentomas de ovejas cursando preñeces normóxicas, logrando las mayores alzas de actividad en días cercanos a los 60 de gestación, declinando luego de esto y obteniendo un segundo "peak" luego de los 100-120 días de gestación. Las diferencias entre los resultados de los distintos estudios podrían explicarse por variaciones en la concentración de estas moléculas en los tejidos analizados, sin dejar de lado que nuestras muestras fueron analizadas a los 100 días de gestación, período que según el estudio realizado por Kwon *et al.* (2004), sería el comienzo de la expresión o actividad de estas moléculas, previo a una baja que no mostró presencia de estas. Además, los resultados de este autor se obtuvieron bajo normoxia.

El estado hipoxémico que se espera observar por efecto de la altura, fue evidenciado en todos los grupos analizados luego de la medición de gases sanguíneos. La PaO₂ fue menor en ambos grupos sin suplementación vitamínica, presentando el valor más bajo el grupo LH. La PaCO₂ no presentó diferencias significativas para los grupos con distintos tiempos de exposición a hipoxia. En los grupos suplementados con vitaminas la PaO₂ aumentó. Los resultados son similares a los reportados previamente por Atlagich *et al.*, (2007) a los 110-120 días de gestación. Los valores para hematocrito (Ht) y concentración de hemoglobina (Hb) fueron más altos en los grupos LH y HH presentando bajas en los grupos suplementados con vitaminas, mientras que lo contrario ocurrió con la saturación de hemoglobina (SatHb), siendo mayores los valores en los grupos que recibieron antioxidantes (Atlagich *et al.*, 2007). En preñeces de altura el Ht y la concentración de Hb están aumentados, indicando la presencia de hipoxia y un estímulo incrementado para la producción de eritrocitos (Ballew y Haas, 1986). Así también podríamos pensar que los menores valores de SatHb observados en los grupos no suplementados, además de las alteraciones en los valores sanguíneos ya nombradas, pueden derivar del efecto que ejercen las ROS sobre los alvéolos y capilares alveolares, dificultando la hematosis normal por edema e inflamación (Uzun *et al.*, 2006).

Como ya sabemos, la exposición a hipoxia de altura está asociada con baja en la presión de oxígeno, lo que puede resultar en estrés oxidativo, un aumento en la generación de ROS y daño oxidativo celular. La severidad de este daño aumenta junto con la altura, la que parece debilitar los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos del organismo, por lo que, una suplementación en la dieta de vitaminas antioxidantes es beneficiosa para reducir el daño oxidativo inducido por la altura (Dosek *et al.*, 2007). Las concentraciones de vitaminas sanguíneas fueron medidas para observar los cambios que podrían evidenciarse en plasma luego de la administración oral diaria de éstas por el período que duró el estudio. Es comúnmente aceptado que los rumiantes, junto con otros animales, como perros y ratas, tienen la capacidad de sintetizar su propio ácido ascórbico o vitamina C, pero bajo ciertas circunstancias de estrés y aclimatización, estos animales pueden llegar a requerir suplementación de este antioxidante, especialmente para la prevención de enfermedades del tracto respiratorio (Black y Hidirolou, 1996).

Cabe señalar también que existe controversia respecto si la administración oral de vitamina C produciría cambios a nivel plasmático en su concentración en rumiantes. Algunos autores indican que, debido a la degradación que se produce en el rumen de estos animales, la administración oral de vitaminas no produciría efectos en su concentración sanguínea (Knight *et al.*, 1941). En la actualidad otros autores han demostrado que la administración oral de este antioxidante sí es efectiva para lograr mayores concentraciones plasmáticas de la vitamina, administrándola durante más de 5 días (Hidirolou *et al.*, 1997; Hidirolou, 1999), utilizando tanto presentaciones nuevas adaptadas para la administración a rumiantes, recubiertas, para evitar la degradación a nivel ruminal, y presentaciones tradicionales sin recubrimiento. Además la suplementación oral sigue siendo la vía de administración preferida por sobre las demás, siendo la intravenosa (IV) muy efectiva pero costosa y la intramuscular (IM) también efectiva pero puede causar una irritación importante en el sitio de inyección en aplicaciones reiteradas. Los resultados de nuestro trabajo coinciden con estos últimos estudios, ya que los grupos suplementados con vitaminas C y E presentaron mayores concentraciones sanguíneas de éstas, en comparación con los grupos no suplementados. Estos resultados son concordantes con los cambios observados tanto en placenta como en el feto en los grupos que fueron suplementados con vitaminas (HHV y LHV).

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, podríamos deducir que la suplementación oral de vitaminas antioxidantes C y E disminuye la expresión de factores de crecimiento como el VEGF, Leptina y eNOS en la placenta ovina, debido a que ayuda a contrarrestar los efectos del daño oxidativo producido por la exposición a hipoxia hipobárica. Las diferencias observadas en la expresión de estos factores de crecimiento, entre los distintos grupos analizados nos ayuda a entender como influye la altura en el desarrollo gestacional del ovino, y como la hipoxia hipobárica puede llegar a producir cambios importantes en la reproducción de ovinos, como el peso al nacimiento, evidentemente más bajos que aquellos observados a nivel del mar.

CONCLUSION

La suplementación diaria de vitaminas antioxidantes C y E ayuda a prevenir los efectos producidos en la placenta y en el feto debido a la presencia de estrés oxidativo en animales que gestan en altura, pudiendo lograr de esta forma un desarrollo gestacional equivalente al observado en animales que gestan a nivel del mar, debido a que la terapia antioxidante logra una disminución de la expresión de factores angiogénicos, lo que produciría una mejora en las propiedades funcionales de la placenta y en el desarrollo fetal. Finalmente, gracias a estos resultados podemos concluir que la terapia con vitaminas C y E puede utilizarse como una importante herramienta para lograr una mayor eficiencia en la producción ovina de altura, logrando aumentar efectivamente los pesos al nacimiento.

REFERENCIAS

- Agarwal A., Gupta S. and Sharma R. 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3: 1-21.
- Ahmed A., Dunk C., Kniss D. and Wilkes M. 1997. Role of VEGF receptor-1 (Flt-1) in mediating calcium-dependent nitric oxide release and limiting DNA synthesis in human trophoblast cells. *Laboratory Investigation* 76: 779-791.
- Atlagich M., Araneda O., García C., Raggi L.A., Kooyman D.L., De los Reyes M. and Parraguez V.H. 2007. Effect of antioxidant vitamins on newborn and placental traits in gestations at high altitude: comparative study in high- and low-altitude native sheep. *Enviado a Reproduction, Fertility and Development*.
- Ballew C. And Haas J.D. 1986. Hematologic evidence of fetal hypoxia among newborn infants at high altitude in Bolivia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 155:166-169.
- Beall C.M. 2007. Two routes to functional adaptation: Tibetan and Andean high-altitude natives. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104: 8655-8660.
- Black W.D. and Hidiroglou. 1996. Pharmacokinetic study of ascorbic acid in sheep. *Canadian Journal of Veterinary Research* 60: 216-221.
- Bogic Lj.V, Brace R.A. and Cheung C.Y. 2000. Cellular localization of vascular endothelial growth factor in ovine placenta and fetal membranes. *Placenta* 21:203-209.
- Bouloumié A., Drexler H., Lafontan M. and Busse R. 1998. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circulation Research* 83: 1059-1066.
- Buchbinder A., Lang U., Baker R.S., Khoury J.C., Mershon J, Clark K.E. 2001. Leptin in the ovine fetus correlates with fetal and placental size. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 185: 786-791.
- Chappell L.C., Seed P.T., Kelly F.J., Briley A., Hunt B.J., Charnock-Jones S., Mallet A. and Poston L. 2002. Vitamin C and E supplementation in women at risk of preeclampsia is associated with changes in indices of oxidative stress and placental function. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 187: 777-784.
- Cheung C.Y. and Brace R.A. 1998. Ovine vascular endothelial growth factor: nucleotide sequence and expression in fetal tissues. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 16: 11-22.
- Cheung C.Y. 1997. Vascular endothelial growth factor: Possible role in fetal development and placental function. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 4: 169-177.
- Cheung C.Y., Singh M., Ebaugh M.J and Brace R.A. 1995. Vascular endothelial growth factor gene expression in ovine placenta and fetal membranes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 173: 753-759.
- Dosek A., Ohno H., Acs Z., Taylor A.W. and Radak Z. 2007. High altitude and oxidative stress. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 158:128-131.
- Farina M., Ribeiro M.L. and Franchi A. 2001. Nitric oxide synthases in pregnant rat uterus. *Reproduction* 121: 403-407.
- Ferrara N. 1999. Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *Journal of Molecular Medicine* 77: 527-543.
- Fryer B.H., Simon M.C. 2006. Hypoxia, HIF and the placenta. *Cell Cycle* 5: 495-498.
- Gazítúa F.J., Corradini P., Ferrando G., Raggi L.A. and Parraguez V.H. 2001. Prediction of gestational age by ultrasonic fetometry in llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Lama pacos*). *Animal Reproduction Science* 66: 81-92.
- Gonzales G.F. 2007. Peruvian contributions to the study on human reproduction at high altitude: From the chronicles of the Spanish conquest to the present. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 161: 1-8.
- Hafez E.S.E and Hafez B. *Reproducción e Inseminación Artificial en Animales*. 7ªed. México, DF: MacGraw-Hill Interamericana, 2002, p. 148.

- Hägg M. and Wennström S. 2005. Activation of hypoxia-induced transcription in normoxia. *Experimental Cell Research* 306: 180-191.
- Hauguel-de Mouzon S., Lepercq J., Catalano P. 2006. The known and unknown of leptin in pregnancy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 194: 1537-1545.
- Hidioglou M. 1999. Technical note: Forms and route of vitamin C supplementation for cows. *Journal of Dairy Sciences* 82: 1831-1833.
- Hidioglou M., Batra T.R. and Zhao X. 1997. Comparison of vitamin C bioavailability after multiple or single oral dosing of different formulations in sheep. *Reproduction Nutrition Development* 37: 443-448.
- INEI, 2001. Encuesta Demográfica y de Salud Familiar (Perú). 2000. Instituto Nacional de Estadística e Informática, Lima, Perú.
- Jacobs R., Robinson J.S., Owens J.A., Falconer J. and Webster M.E. 1988. The effect of prolonged hypoxia on growth of fetal sheep. *Journal of Developmental Physiology* 10:97-112.
- Julian C.G., Vargas E., Armaza J.F., Wilson M.J., Niermeyer S. and Moore L.G. 2007. High-altitude ancestry protects against hypoxia-associated reductions in fetal growth. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal* 92: 372-377.
- Knight C.A., Dutcher R.A., Guerrant N.B. and Bechtel S. 1941. Destruction of ascorbic acid in the rumen of dairy cows. *Journal of Dairy Sciences* 24: 567-577.
- Krebs C., Longo L.D. and Leiser R. 1997. Term ovine placental vasculature: Comparison of sea level and high altitude conditions by corrosion cast and histomorphometry. *Placenta* 18:43-51.
- Kwon H., Wu G., Meininger C.J., Bazer F.W., Spencer Th.E. 2004. Developmental changes in nitric oxide synthesis in ovine placenta. *Biology of Reproduction* 70:679-686.
- Landvik Sh.V., Diplock A.T. and Packer L. 2002. Efficacy of vitamin E in human health and disease. Cap.4. In: *Handbook of antioxidants*. 2^a Ed. Cardenas E., Packer L. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. N.Y. U.S.A, s/p.
- Lang U., Baker R.S., Khoury J. and Clark K. 2000. Effects of chronic reduction in uterine blood flow on fetal and placental growth in the sheep. *The American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 279:53-59.
- Lee J., Bae S., Jeong J., Kim S. and Kim K. 2004. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Experimental and Molecular Medicine* 36: 1-12.
- Matsumoto L.C., Bogic L., Brace R.A. and Cheung C.Y. 2002. Prolonged hypoxia upregulates vascular endothelial growth factor messenger RNA expression in ovine fetal membranes and placenta. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 186: 303-310.
- Mayhew T.M., Charnock-Jones D.S and Kaufmann P. 2004. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 25:127-139.
- McAuliffe F., Kametas N., Krampfl E., Ernsting J. and Nicolaides K. 2001. Blood gases in pregnancy at sea level and at high altitude. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 108: 980-985.
- Moore L.G., Young D., McCullough R.E., Droma T. and Zamudio S. 2001. Tibetan protection from intrauterine growth restriction (IUGR) and reproductive loss at high altitude. *American Journal of Human Biology* 13: 635-644.
- Moore L.G., Shriver M., Bemis L., Hickler B., Wilson M., Brutsaert T., Parra E. and Vargas. 2004. Maternal Adaptation to High-altitude Pregnancy: An Experiment of Nature-A Review. *Placenta* 18: 60-71.
- Nevo O., Soleymanlou N., Wu Y., Xu J., Kingdom J., Many A., Zamudio S and Caniggia I. 2006. Increased expression of sFlt-1 in vivo and in vitro models of human placental hypoxia is mediated by HIF-1. *The American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 291: 1085-1093.
- Padayatty S.J., Daruwala R., Wang Y., Eck P.K., Song J., Koh W.S., Levine M. 2002. Vitamin C: from molecular actions to optimum intake. Cap.4. In: *Handbook of antioxidants*. 2^a Ed. Cardenas E., Packer L. (Eds.), Marcel Dekker, Inc. N.Y. U.S.A, s/p.
- Parraguez V.H., Atlagich M., Diaz R., Bruzzone M.E., Behn C. and 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., Diaz R., Cepeda R., González C., De los Reyes M., Bruzzone M.E., Behn C. and Raggi L.A. 2006. Ovine placenta at High altitudes: Comparison of animals with different times of adaptation to hypoxic environment. *Animal Reproduction Science* 95:151-157.

- Penninga L., Longo L.D. 1998. Ovine placentoma morphology: effect of high altitude, long-term hypoxia. *Placenta* 19: 187-193.
- Pialoux V., Mounier R., Brown A.D, Steinback C.D., Rawling J.M. and Poulin M.J. 2008. Relationship between oxidative stress and HIF-1 α mRNA during sustained hypoxia in humans. *Free Radical Biology and Medicine* 4C:1-6.
- Reynolds L.P., Borowicz P.P., Vonnahme K.A, Johnson M.L., Grazul-Bilska A.T., Redmer D.A., Caton J.S. 2005. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *The Journal of Physiology* 565.1: 43-58.
- Rosselli M., Keller P.J. and Dubey R.K. 1998. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction. *Human Reproduction Update* 4: 3-24.
- Salonen J.T, Nyyssonen K., Salonen R., Lakka H.M., Kaikkonen J., Porkkala-Sarataho E. 2000. Antioxidant Supplementation in Atherosclerosis Prevention (ASAP) study: a randomized trial of the effect of vitamins E and C on 3-year progression of carotid atherosclerosis. *Journal of Internal Medicine* 248: 377-386.
- Schulz S., Häckel C. and Weise W. 2000. Hormonal regulation of neonatal weight: placental leptin and leptin receptors. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 107: 1486-1491.
- Uzun Ö., Balbay Ö, Çomunoglu N.Ü., Yavuz Ö., Annakkaya A.N., Güler S., Silan C., Erbas M. and Arbak P. 2006. Hypobaric-Hypoxia-induced pulmonary damage in rats ameliorated by antioxidant erdosteine. *Acta Histochemica* 108: 59-68.
- Vonnahme K.A., Wilson M.E., Li Y., Rupnow H.L. Phernetton T.M., Ford S.P. and Magness R.R. 2005. Circulating levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor throughout ovine pregnancy. *The Journal of Physiology* 565: 101-109.
- White I.R., Russel A.J., Wright I.A and Whyte T.K. 1985. Real-time ultrasonic scanning in the diagnosis of pregnancy and the estimation of gestational age in cattle. *The Veterinary Record* 117: 5-8.
- Xiao D., Bird I.M., Magness R.R., Longo L.D. and Zhang L. 2001. Upregulation of eNOS in pregnant ovine uterine arteries by chronic hypoxia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 280: 812-820.
- Yee G., Yu Y., Walsh W.R., Lindeman R. and Poole M.D. 2003. The immunolocalisation of VEGF in the articular cartilage of sheep mandibular condyles. *Journal of Cranio Maxillofacial Surgery* 31: 244-251.
- Zamudio S. 2003. The placenta at high altitude. *High Altitude Medicine and Biology* 4: 171-191.
- Zheng J., Li Y., Weiss A.R., Bird I.M. and Magness R.R. 2000. Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthases and nitric oxide production in ovine placental and uterine tissues during late pregnancy. *Placenta* 21: 516-524.
- Zygmunt M., Herr F., Münstedt K., Lang U. And Liang O.D. 2003. Angiogenesis and vasculogénesis in pregnancy. *Obstetrics and Gynecology* 110: 10-18.