



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

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN LA EXPRESIÓN  
DE APOPTOSIS EN CUERPOS LÚTEOS DE OVEJAS SOMETIDAS A ESTRÉS  
OXIDATIVO INDUCIDO POR HIPOXIA HIPOBÁRICA DE ALTURA

NATALY BENAVIDES AGUILA

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Biológicas Animales

PROFESOR GUÍA: VÍCTOR H. PARRAGUEZ GAMBOA

Universidad de Chile

SANTIAGO, CHILE

2015

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1100189



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE ANTIOXIDANTES EN LA EXPRESIÓN  
DE APOPTOSIS EN CUERPOS LÚTEOS DE OVEJAS SOMETIDAS A ESTRÉS  
OXIDATIVO INDUCIDO POR HIPOXIA HIPOBÁRICA DE ALTURA

NATALY BENAVIDES AGUILA

Memoria para optar al Título

Profesional de Médico Veterinario

Departamento de Ciencias Biológicas Animales

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA: DR. VÍCTOR H. PARRAGUEZ G.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DRA. BESSIE URQUIETA M.	.....	.....
PROFESOR CONSEJERO: DRA. MÓNICA DE LOS REYES S.	.....	.....

SANTIAGO, CHILE

2015

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1100189

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quisiera dar las gracias a mi profesor guía, el Dr. Víctor Hugo Parraguez, por darme la oportunidad de realizar mi memoria de título bajo su tutela. Finalizar este proceso con éxito se debió en gran medida a su paciencia y dedicación.

Agradezco la labor de mis profesores consejeros por sus acertadas correcciones y especialmente a la Dra. Bessie Urquieta por su disposición. Sus aportes y sugerencias a la totalidad de este trabajo fueron más allá de su obligación.

Quisiera agradecer también a Eileen Narbona por su asesoría en la ejecución práctica de esta memoria. Descubrí a una profesional solícita y generosa presta a ayudar en todo momento a los tesisistas del departamento.

Finalmente, mi agradecimiento a mis padres y a mi hermano, pues sólo con su apoyo constante e inagotable he logrado recorrer este y otros caminos con éxito. Son los pilares que me dan fuerza para emprender nuevos proyectos.

## ÍNDICE DE CAPÍTULOS

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
HIPÓTESIS	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Lugar	9
Animales	9
Manejo de los animales	10
Manejo de muestras	10
Análisis estadístico	11
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	16
CONCLUSIÓN	20
BIBLIOGRAFÍA	21

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Imágenes representativas del tejido luteal y la identificación <i>in situ</i> de los núcleos apoptóticos en CLs de ovejas ciclando a 3600 m de altura.	12
<b>Figura 2.</b> Efectos de la altura y del tratamiento antioxidante sobre el número total de células en CLs de ovejas ciclando a 3600 m de altura y a nivel del mar.	13
<b>Figura 3.</b> Efectos de la altura y del tratamiento antioxidante sobre el número total de células apoptóticas en CLs de ovejas ciclando a 3600 m de altura y a nivel del mar.	14
<b>Figura 4.</b> Efectos de la altura y del tratamiento antioxidante sobre la proporción de células apoptóticas en CLs de ovejas ciclando a 3600 m de altura y a nivel del mar.	15

## RESUMEN

La hipoxia hipobárica de altura tiene efectos significativos en varias características del proceso de reproducción ovino, donde el estrés oxidativo cumple un rol fundamental. En este estudio se evaluó el efecto de la hipoxia y/o el estrés oxidativo sobre la densidad de células luteales y la expresión de apoptosis en cuerpos lúteos (CLs) de ovejas que ciclaron en altura y a nivel del mar, analizando además el efecto de la suplementación con vitaminas antioxidantes C y E. Se obtuvieron CLs de ovejas nativas de baja altura que ciclaron a nivel del mar y en altura y CLs de ovejas nativas de altura que ciclaron en altura. Las ovejas se organizaron en grupos con y sin suplementación con vitaminas antioxidantes C (500 mg) y E (350 UI), la cual se realizó en el lugar en que ciclaron las ovejas. Se evaluó la expresión de apoptosis a través de la técnica inmunohistoquímica TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling). Los datos obtenidos se analizaron por medio de análisis de varianza (ANDEVA). La incidencia de apoptosis (células positivas para TUNEL) en los CLs fue mayor en ovejas expuestas a la altura. La suplementación con vitaminas no mostró efectos a nivel del mar, mientras que en ovejas expuestas a la altura presentó un efecto diferente, incrementando la frecuencia de apoptosis en las nativas del nivel mar que ciclaron en altura y disminuyendo ésta en las nativas de la altura. Según estudios anteriores la respuesta diferente en estos grupos podría deberse a la menor expresión de factores citoprotectores, como a la disminuida disponibilidad plasmática de la hormona luteotrópica (*LH*), sumado a la escasa vascularización luteal, en el caso de las nativas del nivel del mar expuestas a la altura; y al aumento tanto en la disponibilidad plasmática de la *LH* como en la vascularización del tejido luteal, en el caso de las nativas de altura. En conclusión, la suplementación con vitaminas antioxidantes C y E contrarresta la apoptosis en CLs desarrollados en condiciones de estrés oxidativo inducido por hipoxia hipobárica de altura, sólo en los animales ambientados a esta condición, mientras que en CLs de ovejas recientemente expuestas a la altura no generó los efectos esperados.

## ABSTRACT

High altitude hypobaric hypoxia has significant effects on several traits of sheep breeding process where oxidative stress plays a fundamental role. In this study the effect of hypoxia and/or oxidative stress on luteal cells density and apoptosis expression in *corpora lutea* (CL) of sheep cycling at high and low altitude was evaluated. The effect of supplementation with antioxidant vitamins C and E was also tested. CLs from low altitude natives ewes, whose cycle were at sea level and at high altitude and CLs from high altitude native ewes, whose cycle were at high altitude were obtained. Ewes were organized into groups with and without supplementation with antioxidant vitamins C (500 mg) and E (350 IU) that was performed in the place in which the sheep were cycling. The expression of apoptosis was assessed through TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling) technique. The data obtained were analyzed through analysis of variance (ANOVA). The incidence of apoptosis (TUNEL-positive luteal cells) in CLs was higher in sheep exposed to high altitude. Vitamin supplementation showed no effect at sea level, while in sheep exposed to high altitude it showed a different effect, increasing the frequency of apoptosis in sea level natives ewes and decreasing it in the high altitude natives ewes. According to previous studies, the different response in these groups could be caused by lower expression of cytoprotective factors as well as to the reduced availability of luteotropic plasma hormone (*LH*), in addition to poor luteal vascularization, in the case of sea level natives; and in the case of natives to high altitude, to increased availability in both plasma *LH* and luteal tissue vascularization. In conclusion, supplementation with antioxidant vitamins C and E, counteracts apoptosis in CLs developed in conditions of oxidative stress induced by high altitude hypobaric hypoxia, only in animals acclimated to this condition, while in CLs from ewes that were recently exposed to cycling at high altitude, it did not generate the expected effects.

## INTRODUCCIÓN

Aunque existen registros de miles de años que demuestran la existencia de vida humana a gran altura (>3000 m.s.n.m.), aun hoy, la baja concentración de oxígeno propia de este ambiente sigue generando efectos adversos sobre la salud reproductiva. Diversos estudios han demostrado alteraciones como baja fertilidad, partos prematuros o complicados con patologías como pre-eclampsia, diabetes gestacional e incluso aborto, recién nacidos con peso bajo al nacimiento y mayor mortalidad neonatal. Todas estas alteraciones se hacen aún más evidentes cuando se trata de poblaciones recién expuestas a este ambiente, lo que sugiere cierto nivel de adaptación de los habitantes nativos de gran altura, dado principalmente por el mayor tiempo de residencia.

Alrededor de 140 millones de personas viven en forma permanente a gran altura, distribuidas entre América, África y Asia. Por esta razón, es importante realizar estudios que permitan determinar aspectos que mejoren los procesos reproductivos tanto humanos como animales. En este sentido, los resultados obtenidos a partir de ensayos realizados con el modelo ovino son de gran valor, permitiendo por un lado, mejorar la productividad de esta especie que resulta ser un recurso económico importante para los habitantes rurales en zonas de gran altura y por otro lado, aportar información relevante que puede ser extrapolada a la población humana que, por razones éticas, no podría ser obtenida directamente a partir de estudios en personas.

Se sugiere que el estrés oxidativo inducido por hipoxia hipobárica de altura es uno de los responsables de la baja fertilidad en este ambiente. Hipótesis que se ve reforzada por ensayos en los que la suplementación con antioxidantes (vitaminas C y E) genera un efecto positivo, aumentando la fertilidad de ovejas nativas de altura y previniendo su disminución en ovejas recientemente expuestas a ciclar en este ambiente. Esta baja fertilidad podría ser el resultado de la alteración en el desarrollo y función del cuerpo lúteo (CL) que, en estas ovejas, se caracteriza por presentar un menor tamaño que a nivel del mar.

En este estudio se evaluó el efecto de la hipoxia y/o el estrés oxidativo inducido por hipoxia, sobre la densidad de células luteales y la magnitud de la expresión de apoptosis en cuerpos lúteos (CLs) de ovejas que ciclaron en altura y a nivel del mar, analizando además el efecto de la suplementación con vitaminas antioxidantes C y E.



## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La vida a gran altura se caracteriza por un entorno con predominio de baja presión barométrica, frío, aridez y alta radiación cósmica y solar (Gonzales, 2007). La presión atmosférica es menor que a nivel del mar, dando lugar a un ambiente con una presión parcial de oxígeno ( $pO_2$ ) disminuida (3000 m.s.n.m., presión barométrica ~ 795 hPa,  $pO_2$  78% en relación al nivel del mar). Esto a su vez genera una reducción en la  $pO_2$  a nivel arterial y por ende la cantidad de oxígeno disponible para los tejidos decae (Frisancho, 2013).

La exposición a la menor presión de oxígeno conduce a un escenario complejo de cambios tanto metabólicos como fisiológicos. Uno de ellos es el estrés oxidativo (OS) derivado del exceso de producción de las especies reactivas del oxígeno (ROS) que superan la capacidad antioxidante natural del organismo y cuya consecuencia es la generación de daño celular (Møller *et al.*, 2001).

Se ha reportado que las ROS pueden causar daño tanto en el ácido desoxirribonucleico (ADN) como en las proteínas, además de peroxidación lipídica alterando la estructura y función de las membranas (Rizzo *et al.*, 2012). En el caso del sistema reproductor femenino, existe evidencia de que las ROS pueden generar problemas de infertilidad y diversos trastornos reproductivos. El OS tiene un papel importante en enfermedades como abortos, pre-eclampsia, diabetes gestacional y partos prematuros. Por otro lado, se ha demostrado que la formación de ciertos niveles de ROS es normal y cumplirían un importante rol fisiológico en la regulación de distintas funciones celulares tales como maduración de ovocitos, foliculogénesis, esteroidogénesis ovárica y luteólisis (Agarwal *et al.*, 2005).

Los efectos de la altura en la reproducción han sido estudiados tanto en humanos como en animales, concluyéndose que la exposición aguda a la altura resulta en infertilidad transitoria y reversible (Gonzales, 2007). En este sentido, la especie ovina adquiere importancia ya que fue introducida en el altiplano hace aproximadamente 500 años, volviéndose una especie productiva relevante para los ganaderos en altura y en donde las mejoras en salud y producción del ganado ovino pueden significar un beneficio económico.

Además, las ovejas proporcionan un modelo ampliamente reconocido para los estudios biomédicos con importantes implicaciones para la salud reproductiva humana (Parraguez *et al.*, 2013).

Se ha demostrado que la hipoxia hipobárica de altura tiene efectos significativos en varias características del proceso de reproducción ovino, donde la formación de ROS y el estrés oxidativo cumplen un rol fundamental (Parraguez *et al.*, 2011). En el mencionado estudio los autores reportan resultados que indican que el estrés oxidativo derivado de la hipoxia hipobárica de altura tiene un impacto negativo tanto en las características de la placenta como en el recién nacido de ovejas nativas de altura y de tierras bajas que cursaron su gestación en altura. Así, la placenta de estas ovejas se caracterizó por presentar un mayor peso, una disminución del número total de cotiledones e incrementos en el diámetro de los mismos, además de una superficie de contacto cotiledón-carúncula aumentada y una mayor área de superficie del cotiledón ocupada por vasculatura. Mientras que los corderos registraron bajo peso al nacimiento. Sin embargo, todas estas características tendieron a normalizarse producto de la administración de vitaminas antioxidantes C y E que actúan reduciendo el estrés oxidativo y compensando los efectos del ambiente hipóxico.

Se ha señalado que la altura afecta negativamente la fertilidad de ovejas nativas de tierras bajas que han sido expuestas por un corto periodo a este ambiente hipóxico hipobárico, situación que pudo prevenirse parcialmente a través de la administración de vitaminas antioxidantes C y E, sugiriendo la participación del estrés oxidativo en esta condición (Parraguez *et al.*, 2006).

El CL se forma después de la ovulación y su función principal es la producción de progesterona, la cual es necesaria para el establecimiento y mantenimiento de la gestación. Por el contrario, si no se produce preñez, la disminución de la producción de progesterona es importante para el desarrollo de los folículos del siguiente ciclo reproductivo (Sugino, 2006). Diferentes factores pueden perjudicar la fertilidad alterando la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario: la actividad cíclica ovulatoria, la calidad de los folículos preovulatorios, ovocitos, embriones y su viabilidad posterior. Todos estos factores requieren la presencia de un CL completamente funcional. En ovejas sometidas a altura se demostró que la hipoxia hipobárica propia de este ambiente genera alteraciones tanto en el

desarrollo como en la función del CL, resultando ser más pequeños en tamaño que aquellos CLs obtenidos de ovejas que ciclaron a nivel del mar, mientras que se registró un aumento de la concentración de progesterona plasmática, comprometiendo el desarrollo y la maduración de los folículos preovulatorios del siguiente ciclo, lo que podría afectar la fertilidad de las hembras (Parraguez *et al.*, 2013).

Las células luteales, poseen múltiples sitios de producción de ROS y unos pocos para su degradación. Las mayores fuentes intracelulares de ROS incluyen las cadenas transportadoras de electrones en la mitocondria, retículo endoplásmico, membranas nucleares y membranas plasmáticas. Otras fuentes enzimáticas corresponden a la NADPH oxidasa, xantina oxidasa, ciclooxigenasa, monooxigenasa y citocromo P450 (Rizzo *et al.*, 2012). Normalmente la eficiencia de la cadena transportadora de electrones parece ser óptima en un rango fisiológico de concentración de oxígeno, así la energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) es generada sin un exceso de producción de ROS en niveles que puedan incrementar la oxidación de macromoléculas celulares y la subsecuente disfunción o muerte celular. Por el contrario, cuando los niveles de oxígeno aumentan o disminuyen de forma aguda, se genera un desbalance entre el oxígeno y el flujo de electrones, lo que se traduce en un aumento de la producción de ROS (Semenza, 2011).

Las mayores fuentes de ROS en el CL provienen de las propias células luteales a partir de la vía enzimática de la citocromo P450 mitocondrial y de macrófagos que aumentan en número durante la regresión luteal. Existe evidencia que indica que las ROS pueden afectar la producción de progesterona a través de la inhibición de la enzima citocromo P450 mitocondrial y del transporte intracelular de colesterol hacia la mitocondria (Sugino, 2006).

Durante la hipoxia la mitocondria pareciera ser el punto central de control de la apoptosis. Por un lado, las ROS generadas en la cadena transportadora de electrones mitocondrial, en condición de hipoxia, serían las responsables de estabilizar a la subunidad HIF-1 $\alpha$  del Factor Inducible por Hipoxia 1 (HIF-1), un regulador clave en la respuesta a la hipoxia capaz de inducir la apoptosis, prevenir la muerte celular, o incluso estimular la proliferación celular (Chandel *et al.*, 2000; Greijer y Van Der Wall, 2004; Semenza, 2011). Por otro lado, las ROS derivadas de la mitocondria están implicadas en la iniciación de la fase de apoptosis contribuyendo a la señalización de la muerte celular. La acumulación de

ROS precede la despolarización de la membrana mitocondrial, la liberación del *citocromo c*, la activación de caspasas ejecutoras y la condensación nuclear, todos eventos típicos de la apoptosis. Así, la mitocondria está envuelta en la decisión acerca de si la célula debe sobrevivir o no, puesto que puede liberar diversos factores pro-apoptóticos al citoplasma, además de las ROS, que actúan como mediadores de la apoptosis en diferentes niveles (Fleury *et al.*, 2002).

La apoptosis corresponde a un mecanismo para la remoción selectiva de células envejecidas, dañadas o no deseadas. Es un componente esencial de muchos procesos fisiológicos normales tales como la embriogénesis, el desarrollo normal de tejidos y la respuesta inmune (Khosravi-Far y Esposti, 2004). Durante la apoptosis, la célula se somete a un proceso activo de muerte celular, puesto en movimiento por un programa genético (Kannan y Jain, 2000). Las alteraciones incluyen cambios en la membrana celular y formación de ampollas, exposición de fosfatidilserina en la superficie externa de la célula, encogimiento celular con reordenamiento del citoesqueleto, condensación nuclear y fragmentación del ADN. Estos cambios morfológicos culminan en la formación de cuerpos apoptóticos que normalmente son eliminados por fagocitosis (Khosravi-Far y Esposti, 2004). La membrana plasmática de las células apoptóticas tempranas y los cuerpos apoptóticos mantienen su integridad, previniendo fugas de material celular evitando una respuesta inflamatoria y daño del tejido local (Kannan y Jain, 2000).

Hay dos vías principales que están implicadas en la iniciación de la apoptosis, la vía “extrínseca” de los receptores de muerte y la vía “intrínseca” o vía mitocondrial (Kannan y Jain, 2000).

La vía extrínseca se activa tras la unión de citoquinas (FasL, TNF y TRAIL) a los receptores de muerte (miembros de la familia de receptores del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ )) ubicados en la superficie celular. Posterior a esto, en el dominio intracelular del receptor, se agrega una proteína de dominio de muerte asociada a fas (FADD) cuyo dominio interactúa con la procaspasa-8 formando un complejo de señalización inductor de muerte (DISC). De esta forma se activa la caspasa 8 que a su vez continúa con la activación de las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7, lo que lleva a la muerte de las células a través de la

degradación del núcleo y otras estructuras (Kannan y Jain, 2000; Khosravi-Far y Esposti, 2004).

Por otro lado, las mitocondrias serían los organelos intracelulares centrales que participan en la mediación de la mayoría de las vías de la apoptosis. La vía intrínseca o mitocondrial se inicia posterior a una señal de estrés capaz de alterar la membrana externa (ME) de la mitocondria, permitiendo la fuga de proteínas mitocondriales almacenadas entre la ME y la membrana interna (MI) mitocondrial (Khosravi-Far y Esposti, 2004). Posteriormente, el proceso continúa con la formación del poro de transición de permeabilidad (PTP) en la MI y cambios en el potencial de membrana mitocondrial, desencadenando el desacoplamiento de la cadena respiratoria resultante en una sobreproducción de ROS, cese de producción de ATP, fuga de calcio desde la matriz mitocondrial y agotamiento de glutatión y otros agentes reductores (Kannan y Jain, 2000). Probablemente el evento más importante en la vía intrínseca de la apoptosis es la pérdida de la integridad de la ME y la consiguiente liberación de proteínas mitocondriales entre las que se encuentra el *citocromo c*, responsable de activar al factor activador de proteasas apoptóticas-1 (Apaf-1) para formar el apoptosoma, cuya función es activar a la procaspasa-9 que a su vez activará a las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7, responsables de la muerte celular (Khosravi-Far y Esposti, 2004).

Normalmente, en la etapa de regresión luteal, la apoptosis inducida por ROS tendría un rol protagónico en el desarrollo de la luteólisis funcional y estructural, puesto que la prostaglandina F2 alfa (PGF<sub>2α</sub>) genera una disminución en el flujo sanguíneo del CL con la consecuente sobreproducción de ROS, que junto con disminuir la expresión de proteínas antioxidantes, conduce finalmente a la inhibición de la síntesis de progesterona y a la activación de la apoptosis (Sugino, 2006; Al-Gubory *et al.*, 2012). Se suman a este proceso, los macrófagos que aumentan en número en el CL en regresión, produciendo gran cantidad de ROS y citoquinas como el TNF $\alpha$ , contribuyendo a la luteólisis funcional y estructural (Sugino, 2006).

Por otro lado, la apoptosis también puede ser inducida por hipoxia, a través de la estabilización de la subunidad HIF-1 $\alpha$ , responsable de incrementar la expresión de distintas proteínas proapoptóticas como Bax y BNIP3 (Greijer y Van Der Wall, 2004). Nishimura *et*

*al.* (2008), demostraron la presencia de apoptosis en células luteales bovinas expuestas a la hipoxia, concluyendo que la baja concentración de oxígeno induce la muerte de las células luteales a través de incrementar la expresión de la proteína BNIP3 (que promueve la liberación de factores proapoptóticos, como el *citocromo c*, desde la mitocondria hacia el citosol) y de disminuir la producción de progesterona, cuya alta concentración tendría un rol supresor de la apoptosis a través de la inhibición de la caspasa 3, perdiéndose este efecto y resultando en la muerte de las células luteales.

Así, en la determinación de la vida útil del CL, el equilibrio entre la capacidad antioxidante y la producción de ROS se vuelve un factor crucial para su integridad y función. En este sentido y en condiciones de estrés oxidativo inducido por hipoxia hipobárica de altura, la suplementación con vitaminas antioxidantes C y E podría ejercer un rol benéfico en la viabilidad del CL.

## **HIPÓTESIS**

La suplementación de vitaminas antioxidantes C y E, en condiciones de estrés oxidativo inducido por hipoxia hipobárica de altura, contrarresta la expresión de apoptosis en cuerpos lúteos de ovejas sometidas a esta condición.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la administración diaria de la combinación de vitaminas C y E, sobre la expresión de la apoptosis en cuerpos lúteos de ovejas nativas de altura y ovejas expuestas por un corto periodo a condiciones de estrés oxidativo inducido por hipoxia hipobárica de altura.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar la expresión de apoptosis en cuerpos lúteos de ovejas que ciclan en altura y a nivel del mar.
2. Caracterizar la expresión de apoptosis en cuerpos lúteos de ovejas recientemente expuestas a ciclar en altura.
3. Comparar la expresión de apoptosis en cuerpos lúteos, entre ovejas nativas de altura y ovejas recientemente expuestas a la altura.
4. Comparar la expresión de apoptosis en cuerpos lúteos, entre ovejas tratadas y no tratadas con vitaminas antioxidantes C y E.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo del presente trabajo, se utilizaron muestras de ovarios con CLs de cinco días de desarrollo, obtenidos en un experimento previo, realizado bajo las condiciones y protocolo descritos a continuación.

**Lugar:** El estudio se realizó en el Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS) de la Universidad de Chile, ubicado a 3600 m.s.n.m. en Putre (presión barométrica ~ 667 hPa, pO<sub>2</sub> 65% en relación al nivel del mar), región de Arica y Parinacota y en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile en Santiago, a 540 m.s.n.m. (presión barométrica ~ 990 hPa, pO<sub>2</sub> 97% en relación al nivel del mar).

**Animales:** Se emplearon 10 ovejas criollas nacidas en alturas sobre 3500 m.s.n.m., descendientes de ovejas introducidas en el altiplano andino desde hace más de 500 años y 20 ovejas criollas nacidas bajo los 600 m.s.n.m., descendientes de ovejas nativas de baja altitud. La mitad de las ovejas nacidas a baja altura fueron trasladadas a las instalaciones del INCAS y la otra mitad se mantuvo a baja altura. Posteriormente, para determinar los efectos del tratamiento antioxidante, las ovejas de cada grupo se distribuyeron al azar en dos subgrupos iguales que se alojaron en corrales diferentes.

Se formaron seis grupos de cinco ovejas cada uno: ovejas nativas de altura mantenidas en altura (HH), ovejas nativas de altura mantenidas en altura con tratamiento antioxidante (HHV), ovejas nativas de baja altitud expuestas a la altura (LH), ovejas nativas de baja altitud expuestas a la altura con tratamiento antioxidante (LHV), ovejas nativas de baja altitud mantenidas a baja altura (LL) y ovejas nativas de baja altitud mantenidas a baja altura con tratamiento antioxidante (LLV).

Las ovejas pertenecientes a los grupos control HH, LH y LL, se alimentaron con 2 kg de heno de alfalfa, suministrados en dos raciones diarias y contaron con agua *ad libitum*. Por otro lado, el tratamiento antioxidante de las ovejas HHV, LHV y LLV comenzó cinco días posteriores al establecimiento de los grupos y se prolongó hasta el final del estudio, siendo alimentadas con una ración individual de 0,3 kg de alfalfa suplementada con 500 mg de vitamina C y 350 UI de vitamina E temprano en la mañana todos los días, para asegurar el



consumo oral de las vitaminas. Posteriormente, las ovejas consumían el alimento restante hasta completar 2 kg de heno de alfalfa por animal al día, al igual que los grupos control.

**Manejo de los animales:** Una semana después del establecimiento de los grupos se inició la sincronización reproductiva de las ovejas. Se administraron dos dosis, separadas por nueve días, de un análogo sintético de la PGF2 $\alpha$  (125  $\mu$ g i.m. de cloprostenol). La detección del celo se realizó diariamente, en ambas localidades, utilizando machos vasectomizados con sus pechos pintados con una mezcla de aceite vegetal y tierra de color, los cuales fueron introducidos en los corrales de ovejas inmediatamente después de la segunda administración de cloprostenol. A partir del segundo celo, se realizaron ecografías diarias para evaluar el tamaño de los folículos preovulatorios y el crecimiento del CL de cada oveja. Paralelamente, se hizo muestreo de sangre arterial y venosa para evaluar el estado de oxigenación y estrés oxidativo respectivamente, análisis que se desarrolló en un estudio previo en el que se comprobó el estado de hipoxemia y estrés oxidativo de las ovejas (presión arterial de oxígeno disminuida, baja saturación de la hemoglobina con oxígeno, aumentos en el hematocrito y en la concentración de hemoglobina y niveles elevados de biomarcadores de daño oxidativo, malondialdehído y grupos carbonilo).

Cinco días posteriores al tercer celo luego de la sincronización (51 a 54 días de tratamiento antioxidante), las ovejas se anestesiaron con ketamina (20 mg/kg) y fueron sometidas a una remoción laparoscópica del ovario que contenía el CL del último ciclo.

**Manejo de muestras:** Los ovarios extraídos se fijaron en paraformaldehído al 4% en buffer fosfato salino (PBS, 0,01 M, pH 7,4) e incluidos en parafina, para la obtención de cortes histológicos de 6  $\mu$ m de grosor, que se utilizaron para evaluación del proceso apoptótico mediante la técnica TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labeling). Un sello distintivo de la apoptosis es la ruptura internucleosomal del ADN en pequeños fragmentos de 180 a 200 pares de bases. Este fenómeno puede ser visualizado a través de la técnica TUNEL que proporciona información sobre el destino de una célula individual en una población celular dada, en secciones histológicas, sin la alteración de la morfología de los tejidos (Loo, 2011). Se utilizó el kit comercial *In Situ* Cell Death Detection Kit, POD (Roche Diagnostic Ltd., Mannheim, Alemania) siguiendo el protocolo descrito por Santos *et al.* (2014). Las muestras fueron desparafinadas y rehidratadas en una serie gradual de

alcoholes terminando en agua destilada. La recuperación de antígenos se realizó sumergiendo los cortes en buffer citrato (0,1 M, pH 6,0) y exponiéndolos a la temperatura del horno microondas a 300 W por 6 min. Luego se procedió al bloqueo de la peroxidasa endógena, mediante la aplicación de peróxido de hidrógeno al 3% en metanol durante 10 min a temperatura ambiente. Luego de un lavado en buffer Tris-HCL (0,1 M, pH 7,5) por 10 min se realizó la primera incubación con “TUNEL reaction mixture” (mezcla de la enzima terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) con un nucleótido marcado con fluoresceína) a 37 °C durante 1 hora seguido de una segunda incubación con el “Converter-POD” (anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con peroxidasa) a 37 °C durante 30 min. La fragmentación del ADN fue revelada por incubación con DAB (3,3'-Diaminobencidina tetrahidrocloreuro, Sigma-Aldrich Inc.) durante 1 min. Todos los lavados se realizaron con PBS. Finalmente, se hizo una contratinción ligera con hematoxilina-eosina (H-E). Las muestras fueron deshidratadas en etanol y aclaradas en xileno. El control negativo fue procesado idénticamente, aunque en la primera incubación la enzima TdT fue omitida. El control positivo se realizó incubando la muestra con DNasa I (DNase I, RNase-free, Thermo Scientific Inc.). Se procesaron tres cortes por cada ovario, de los cuales se analizaron cuatro campos ópticos por corte, seleccionados al azar, en microscopia de luz con un aumento de 400x. En el análisis se consideró el número total de células y el número de células positivas para TUNEL (apoptóticas) en cada campo. Se contó un promedio de 1489 células por cada CL. Para hacer comparables los resultados, todos los valores se expresan considerando una superficie de 100  $\mu\text{m}^2$  de tejido luteal.

### **Análisis estadístico**

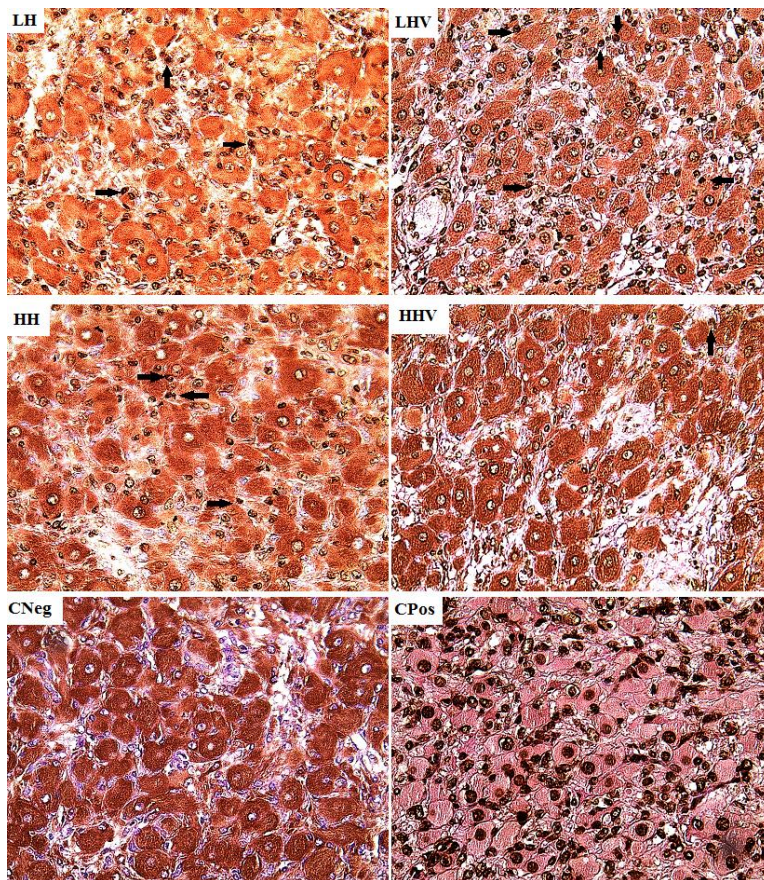
Los datos obtenidos se analizaron por medio de análisis de varianza (ANDEVA), siguiendo el modelo factorial incompleto, donde los factores de variación fueron el origen de la oveja (altura o nivel del mar), lugar donde se desarrolló su actividad reproductiva (altura o nivel del mar) y suplementación con vitaminas (sin o con), mientras que el factor dependiente correspondió a la incidencia de células positivas a TUNEL (células apoptóticas) en las muestras de CLs. Cuando el ANDEVA resultó significativo, se realizó la prueba post-hoc de Duncan con el propósito de establecer cuáles eran los grupos diferentes. Se consideró significación estadística cuando  $P \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

En la figura 1 se presentan imágenes representativas del tejido luteal en fase temprana de desarrollo (5 días) de ovejas que ciclaron en altura. Se aprecia mayor proporción de células luteales apoptóticas (núcleos marrones) en el grupo de ovejas LHV en relación al grupo LH ( $P<0,05$ ), mientras que en el grupo HHV el número de células positivas para la tinción TUNEL fue menor en relación al grupo HH ( $P<0,05$ ). Los resultados del recuento de células luteales totales y de células luteales apoptóticas se presentan más adelante.

**Figura 1**

*Imágenes representativas del tejido luteal y la identificación in situ de los núcleos apoptóticos en CLs de ovejas ciclando a 3600 m de altura.*

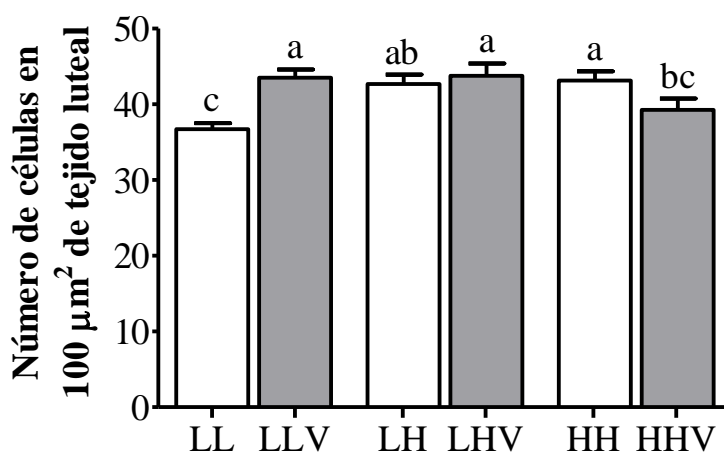


**Técnica TUNEL en CLs de 5 días. Magnificación 400x.** LH: ovejas nativas de baja altitud, expuestas a la altura; LHV: ovejas nativas de baja altitud, expuestas a la altura con tratamiento antioxidante; HH: ovejas nativas de altura, mantenidas en altura; HHV: ovejas nativas de altura, mantenidas en altura con tratamiento antioxidante; CNeg: control negativo procesado en ausencia de la enzima TdT; CPos: control positivo procesado con DNasa I. Las flechas indican núcleos apoptóticos (marrones) con fragmentación del ADN.

El número de células luteales totales (figura 2) varió por efectos de la altura donde ciclaron las ovejas ( $P<0,05$ ) y por la interacción entre la misma con las vitaminas ( $P<0,05$ ). Los grupos de ovejas LL y HHV presentaron los menores recuentos de células luteales, mientras que entre los grupos LLV, LHV y HH no se encontraron diferencias. Los grupos LH y HHV presentaron valores intermedios.

**Figura 2**

*Efectos de la altura y del tratamiento antioxidante sobre el número total de células en CLs de ovejas ciclando a 3600 m de altura y a nivel del mar.*



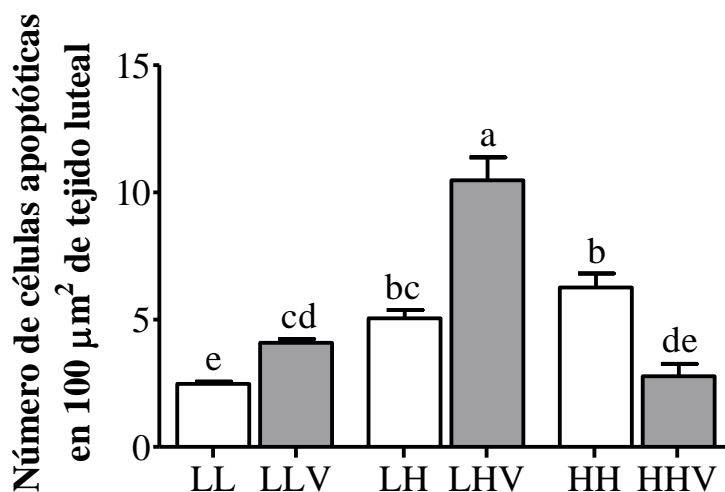
**Recuento de células luteales totales de CLs de 5 días de desarrollo.** LL: ovejas nativas de baja altitud mantenidas a baja altura, LLV: ovejas nativas de baja altitud mantenidas a baja altura con tratamiento antioxidante, LH: ovejas nativas de baja altitud expuestas a la altura, LHV: ovejas nativas de baja altitud expuestas a la altura con tratamiento antioxidante, HH: ovejas nativas de altura mantenidas en altura, HHV: ovejas nativas de altura mantenidas en altura con tratamiento antioxidante. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ( $P<0,05$ , prueba de Duncan).

En la figura 3 se presenta el efecto de la exposición a la altura y de la suplementación con antioxidantes sobre el número de células apoptóticas presentes en CLs de ovejas nativas de la altura y del nivel del mar. Se evidenciaron efectos significativos de la altura de origen

( $P < 0,001$ ) y la altura donde ciclaron las ovejas ( $P < 0,001$ ). No se observó un efecto directo de las vitaminas sobre el número de células apoptóticas presentes en los CLs, pero sí una interacción de éstas con el factor altura de origen ( $P < 0,001$ ), lo que explica que en el caso de las ovejas nativas de baja altura la suplementación con vitaminas incrementa la expresión de células apoptóticas, mientras que en las nativas de la altura ocurre lo contrario. De acuerdo a lo anterior, los grupos LL y HHV presentaron la menor incidencia de células luteales apoptóticas. Por otro lado, el grupo LHV mostró la mayor cantidad de células en apoptosis.

**Figura 3**

*Efectos de la altura y del tratamiento antioxidante sobre el número total de células apoptóticas en CLs de ovejas ciclando a 3600 m de altura y a nivel del mar.*

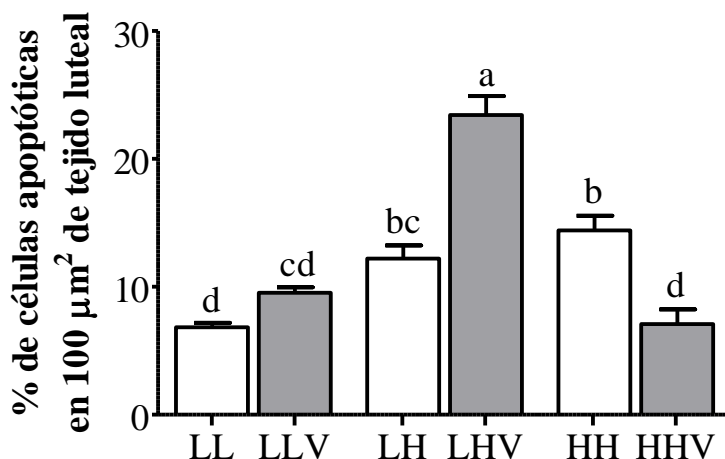


**Recuento de células luteales apoptóticas totales de CLs de 5 días de desarrollo.** LL: ovejas nativas de baja altitud mantenidas a baja altura, LLV: ovejas nativas de baja altitud mantenidas a baja altura con tratamiento antioxidante, LH: ovejas nativas de baja altitud expuestas a la altura, LHV: ovejas nativas de baja altitud expuestas a la altura con tratamiento antioxidante, HH: ovejas nativas de altura mantenidas en altura, HHV: ovejas nativas de altura mantenidas en altura con tratamiento antioxidante. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,05$ , prueba de Duncan).

La proporción de células apoptóticas (figura 4) varió significativamente por efecto tanto de la altura de origen como de la altura donde ciclaron las ovejas ( $P < 0,001$  para ambos efectos). En este caso, tampoco se observó un efecto significativo directo de las vitaminas sobre el número de células apoptóticas presentes en los CLs, pero sí una interacción de estas con la altura de origen ( $P < 0,001$ ). Esto permite explicar el incremento en la proporción de células apoptóticas en las ovejas nativas del nivel mar suplementadas con vitaminas y la disminución de ellas en las ovejas nativas de la altura que recibieron suplemento de vitaminas. La comparación entre los diferentes grupos estableció que la mayor proporción de células apoptóticas la presentó el grupo LHV, seguido por los grupos HH y LH, con los menores valores en los grupos LLV, HHV y LL.

**Figura 4**

***Efectos de la altura y del tratamiento antioxidante sobre la proporción de células apoptóticas en CLs de ovejas ciclando a 3600 m de altura y a nivel del mar.***



**Proporción de células de CLs de 5 días de desarrollo positivas para TUNEL.** LL: ovejas nativas de baja altitud mantenidas a baja altura, LLV: ovejas nativas de baja altitud mantenidas a baja altura con tratamiento antioxidante, LH: ovejas nativas de baja altitud expuestas a la altura, LHV: ovejas nativas de baja altitud expuestas a la altura con tratamiento antioxidante, HH: ovejas nativas de altura mantenidas en altura, HHV: ovejas nativas de altura mantenidas en altura con tratamiento antioxidante. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos ( $P < 0,05$ , prueba de Duncan).

## DISCUSIÓN

En este estudio se hace evidente el efecto negativo de la altura sobre la estructura del CL, puesto que tanto el grupo de ovejas nativas de altura (HH), como el grupo de ovejas recién expuestas (LH), presentaron una mayor incidencia de células luteales apoptóticas comparado con el grupo nativo de baja altura (LL). En un estudio previo, llevado a cabo con las mismas ovejas, hubo alteraciones en los parámetros sanguíneos consistentes con un estado de hipoxemia (presión arterial de oxígeno disminuida, baja saturación de la hemoglobina con oxígeno, aumentos en el hematocrito y en la concentración de hemoglobina) y estrés oxidativo (niveles elevados de biomarcadores de daño oxidativo) en los grupos ovinos LH y HH (Parraguez *et al.*, 2013). La hipoxia y/o el estrés oxidativo de altura parecieran afectar a ambos grupos de manera similar considerando que, tanto el número de células totales, como el número de células apoptóticas y la proporción de células apoptóticas en los CLs de estos grupos no poseen diferencias estadísticamente significativas.

Las principales diferencias aparecen al comparar los grupos LL, LH y HH con sus contrapartes suplementadas con vitaminas antioxidantes (LLV, LHV y HHV). Contrario a lo que cabía esperar, los grupos LLV y LHV presentaron una mayor incidencia de células apoptóticas, aunque entre los grupos LL y LLV no existe diferencia significativa en términos de porcentaje de células apoptóticas. Por otro lado, sólo el grupo HHV respondió de la manera esperada al tratamiento con vitaminas, disminuyendo significativamente el número de células luteales en apoptosis. Aunque la respuesta de las ovejas LHV parezca contradictoria, podría tener explicación en la menor expresión de distintos factores implicados en el desarrollo del CL. En un estudio anterior realizado por Parraguez *et al.* (2013), se demostró que los CLs de ovejas sometidas a estrés oxidativo inducido por hipoxia hipobárica de altura, suplementadas con vitaminas antioxidantes, presentaron menor expresión de los factores de crecimiento VEGF y HIF-1 $\alpha$ . La importancia de estos factores en el desarrollo inicial y la mantención (sobrevivencia) del CL ha sido descrita en diversos estudios (Webb *et al.*, 2002; Berisha y Schams, 2005). El VEGF ha sido considerado como un potente factor mitogénico y citoprotector para las células endoteliales, protegiéndolas de la apoptosis.

El CL es un tejido complejo, su crecimiento posterior a la ovulación es rápido, comparable al desarrollo de un tumor. Los cambios cíclicos en el crecimiento y regresión luteal ocurren con rapidez y demandan cambios igualmente veloces en su vasculatura, por esto la regulación de la angiogénesis es un factor crítico en la función luteal, garantizando el adecuado suministro de gonadotropinas, factores de crecimiento, oxígeno y nutrientes necesarios para el desarrollo del CL (Webb *et al.*, 2002). Al respecto, en un estudio realizado bajo las mismas condiciones que el nuestro, se observó que solo los grupos nativos de altura (HH y HHV) presentaron una mayor vascularización del tejido luteal, mientras que entre los grupos nativos de baja altura (LL, LLV, LH y LHV) no hubo diferencias. En este sentido el grupo LH destacó, puesto que aunque presentó el mayor incremento en la expresión del VEGF no cursó con la correspondiente vascularización del tejido luteal, sugiriéndose una respuesta incompleta a la hipoxia limitada por la corta vida útil del CL (Parraguez *et al.*, 2013). Estos resultados contrastan con los obtenidos en otro estudio en que ovejas preñadas nativas de baja altitud, que cursaron su gestación en altura presentaron placentas cuya vascularización incrementó en concordancia con el aumento en la expresión del VEGF (Parraguez *et al.*, 2010). Así, la diferencia en la respuesta a la hipoxia entre el CL y la placenta, siendo ambos tejidos esteroideogénicos, estaría dada por la mayor vida útil de la placenta (Parraguez *et al.*, 2013).

Existen varios reportes que indican que los efectos de VEGF no sólo se restringirían a los tejidos vasculares. En este sentido, Greenaway *et al.* (2004) demostraron que el VEGF y su receptor (Flk-1/KDR) actuarían reduciendo la incidencia de apoptosis en cultivos de células de la granulosa bovina, disminuyendo la expresión de la caspasa-3 activada, demostrando un nuevo rol citoprotector del VEGF en un tejido no-vascular. Por otro lado, Abramovich *et al.* (2006) concluyeron que la inhibición del VEGF genera un desbalance entre las proteínas antiapoptóticas BCL2 y proapoptóticas BAX, desencadenando un aumento de la apoptosis en células de la granulosa de folículos ováricos de rata. En otro estudio realizado en un modelo de síndrome de hiperestimulación ovárica en ratas, la disminución del VEGF generó incremento en el número de folículos atrésicos y disminución del porcentaje de CLs con aumento en la apoptosis de los mismos (Scotti *et al.*, 2014).



Por su parte, HIF-1 juega un papel clave en la regulación de la homeostasis del oxígeno, regulando la transcripción de cientos de genes en respuesta a la hipoxia, incluyendo aquéllos que codifican para VEGF. La hipoxemia induce un aumento de HIF-1 que lleva a una mayor expresión de VEGF, lo que favorece la angiogénesis y consecuentemente el aumento de la entrega de oxígeno a los tejidos (Zhang *et al.*, 2008). Además, HIF-1 controla una serie de mecanismos orientados a disminuir el flujo de electrones en la cadena transportadora de electrones mitocondrial, contrarrestando la menor eficiencia del transporte en condiciones de hipoxia, ayudando a la mantención de la energía y el balance redox (Semenza, 2011). En el estudio desarrollado por Zhang *et al.* (2008), en cultivos de fibroblastos de embriones de rata sometidos a hipoxia prolongada, se concluyó que HIF-1 induce la autofagia selectiva de las mitocondrias como mecanismo adaptativo necesario para prevenir los excesos en la producción de ROS y la consecuente muerte celular. Esto es importante, puesto que Parraguez *et al.* (2013), demostró que los CLs, tanto de ovejas nativas de altura como de ovejas recién expuestas a ciclar en altura, tratadas con antioxidantes, presentaron una menor expresión de HIF-1 $\alpha$ , lo que podría alterar la respuesta adaptativa a la hipoxia. Así, la disminución en la expresión de los factores VEGF y HIF-1 $\alpha$  podrían generar cierta pérdida de los efectos citoprotectores de estos factores en los CLs de ovejas sometidas a estrés oxidativo inducido por hipoxia hipobárica de altura, tratadas con vitaminas antioxidantes, situación que podría explicar el mayor porcentaje de células apoptóticas presentes principalmente en el grupo de ovejas LHV.

Otros importantes factores de crecimiento involucrados en la regulación del crecimiento luteal son los IGF-I e IGF-II. En rumiantes, se ha reportado la expresión del mRNA de IGF-I, IGF-II y del receptor IGFR-I durante la fase luteal temprana (Berisha y Schams, 2005). La interacción entre los IGF y su receptor IGFR-I ha demostrado ejercer un efecto antiapoptótico en diferentes tipos celulares, incluyendo las células ováricas (Webb *et al.*, 2002). Distintos estudios han relacionado la disminución de la expresión de apoptosis en cultivos de células de la granulosa bovinas y caprinas, cuando el IGF-I ha sido incluido en el medio de cultivo, evidenciando su efecto citoprotector (Yang y Rajamahendran, 2000; Yu *et al.*, 2003; Greenaway *et al.*, 2004). En CLs ovinos de 5 días de desarrollo se encontró que la exposición a la altura, por largos y cortos periodos, disminuyó la expresión de los mensajeros de IGF-I e IGF-II. La suplementación con vitaminas C y E no tuvo efectos, por

lo que los IGFs se presentaron similares en los CLs de ovejas tratadas y no tratadas (Parraguez *et al.*, 2013). En consecuencia, estos CLs se encuentran menos protegidos del eventual inicio del proceso apoptótico.

Cabe destacar que el único grupo que siguió un patrón de respuesta concordante con nuestra hipótesis fue el grupo HHV, presentando en todas las variables analizadas un comportamiento semejante a los grupos del nivel del mar (LL y LLV). Por otra parte, la gran diferencia entre las respuestas de los grupos LHV y HHV, tanto en número de células apoptóticas, como en porcentaje de las mismas, evidencia otro posible efecto adverso de la exposición a la altura sobre estos CLs. En rumiantes domésticos, una de las principales hormonas luteotrópicas que influye en el desarrollo y función del CL es la *LH* (Berisha y Schams, 2005). Esta hormona puede estimular la producción de varios factores antiapoptóticos como la progesterona y el cortisol, previniendo la apoptosis a través de la disminución de la caspasa-3 (Kawaguchi *et al.*, 2013a) y estimulando la expresión intraluteal de distintas enzimas antioxidantes (Cu, Zn-SOD, Mn-SOD y catalasa) protegiendo la función del CL (Kawaguchi *et al.*, 2013b). Parraguez *et al.* (2014) llevaron a cabo un estudio en el cual ovejas nativas de baja altura suplementadas o no (grupos LHV y LH, respectivamente), sometidas por un corto periodo a hipoxia hipobárica de altura, presentaron una menor secreción hipofisiaria de *LH*, mientras que la situación opuesta se dio en las ovejas nativas de altura suplementadas o no (grupos HHV y HH, respectivamente), las que cursaron con un incremento en la disponibilidad plasmática de la hormona, sugiriendo un posible mecanismo de adaptación derivado de la exposición por varias generaciones a este ambiente, lo que podría explicar las diferencias encontradas en nuestros resultados entre ovejas expuestas a la altura por largos y cortos periodos.

De lo anterior se desprende que son diversos los factores que podrían alterar la estructura y viabilidad de los CLs de ovejas expuestas a la altura. En el caso particular del grupo LHV, el efecto de la altura se expresaría mediante la disminución en la expresión de distintos factores citoprotectores como VEGF y HIF-1 $\alpha$ , sumado a la menor disponibilidad plasmática de *LH* y la menor vascularización del tejido luteal, que favorecerían la mayor incidencia de células apoptóticas en este grupo. En las ovejas HHV, en tanto, la baja expresión de apoptosis luteal podría estar más bien asociada a una mayor secreción

hipofisiaria de *LH* y mayor vascularización luteal, características que podrían ayudarle a compensar los otros efectos adversos provocados por la hipoxia y/o el estrés oxidativo sobre la estructura del CL, evitando que sus células ingresen en apoptosis.

## CONCLUSIÓN

La exposición de ovejas a la hipoxia hipobárica de altura altera la estructura y viabilidad del CL, aumentando la incidencia de células apoptóticas. La suplementación con vitaminas antioxidantes generó efectos inesperados en el grupo de ovejas expuesto por un corto periodo al ambiente de altura, lo que podría explicarse por la menor expresión de distintos factores citoprotectores, disminuida disponibilidad plasmática de *LH* y escasa respuesta angiogénica presente en los CLs de estos animales. Sin embargo, el grupo de ovejas nativas de altura respondió de la forma esperada a la suplementación con antioxidantes, generando CLs similares a los de las ovejas mantenidas a nivel del mar, lo que podría deberse a la combinación entre el tratamiento antioxidante y la expresión de distintas respuestas adaptativas a la hipoxia, como son la mayor disponibilidad de la hormona luteotrópica y el incremento en la vascularización del CL, que le permitirían contrarrestar los efectos adversos de la hipoxia y/o el estrés oxidativo sobre la apoptosis de las células luteales. En conclusión, la suplementación con vitaminas antioxidantes C y E, contrarresta la apoptosis en CLs desarrollados en condiciones de estrés oxidativo inducido por hipoxia hipobárica de altura, sólo en los animales ambientados a esta condición, mientras que en CLs de ovejas recientemente expuestas a la altura no generó los efectos esperados.

## BIBLIOGRAFÍA

**ABRAMOVICH D.; PARBORELL F.; TESONE M.** 2006. Effect of a vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibitory treatment on the folliculogenesis and ovarian apoptosis in gonadotropin-treated prepubertal rats. *Biol. Reprod.* 75:434-41.

**AGARWAL A.; GUPTA S.; SHARMA R.** 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 3:1-21.

**AL-GUBORY KH.; GARREL C.; FAURE P.; SUGINO N.** 2012. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reprod. Biomed. Online.* 25:551-60.

**BERISHA B.; SCHAMS D.** 2005. Ovarian function in ruminants. *Domest. Anim. Endocrinol.* 29:305-17.

**CHANDEL N.; MCCLINTOCK D.; FELICIANO C.; WOOD T.; MELENDEZ J.; RODRIGUEZ A.; SCHUMACKER P.** 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  during hypoxia: a mechanism of O<sub>2</sub> sensing. *J. Biol. Chem.* 275:25130-8.

**FLEURY C.; MIGNOTTE B.; VAYSSIÈRE J.** 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie.* 84:131-41.

**FRISANCHO A.** 2013. Developmental functional adaptation to high altitude: review. *Am. J. Hum. Biol.* 25:151-68.

**GONZALES G.** 2007. Peruvian contributions to the study on human reproduction at high altitude: From the chronicles of the Spanish conquest to the present. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 158:172-9.

**GREENAWAY J.; CONNOR K.; PEDERSEN H.; COOMBER B.; LAMARRE J.; PETRIK J.** 2004. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flk-1/KDR, are

cytoprotective in the extravascular compartment of the ovarian follicle. *Endocrinology*. 145:2896-905.

**GREIJER A.; VAN DER WALL E.** 2004. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J. Clin. Pathol.* 57:1009-14.

**KANNAN K.; JAIN S.** 2000. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 7:153-163.

**KAWAGUCHI S.; BOWOLAKSONO A.; SAKUMOTO R.; OKUDA K.** 2013a. Luteoprotective roles of luteinizing hormone are mediated by not only progesterone production but also glucocorticoid conversion in bovine corpus luteum. *Mol. Reprod. Dev.* 80:204-11.

**KAWAGUCHI S.; SAKUMOTO R.; OKUDA K.** 2013b. Induction of the expressions of antioxidant enzymes by luteinizing hormone in the bovine corpus luteum. *J. Reprod. Dev.* 59:219-24.

**KHOSRAVI-FAR R.; ESPOSTI M.** 2004. Death Receptor Signals to Mitochondria. *Cancer. Biol. Ther.* 3:1051-7.

**LOO D.** 2011. In situ detection of apoptosis by the TUNEL assay: an overview of techniques. *Methods. Mol. Biol.* 682:3-13.

**MØLLER P.; LOFT S.; LUNDBY C.; OLSEN NV.** 2001. Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *FASEB. J.* 15:1181-6.

**NISHIMURA R.; KOMIYAMA J.; TASAKI Y.; ACOSTA T.; OKUDA K.** 2008. Hypoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 78:529-36.

**PARRAGUEZ V.; ATLAGICH M.; BEHN C.; BRUZZONE M.; RAGGI L.** 2006. Fertility in ewes at high altitude: comparison between animals with long- and short-time residence at high altitude and the effect of antioxidant vitamins. *Reprod. Domest. Anim.* 41:372.

**PARRAGUEZ V.; ATLAGICH M.; URQUIETA B.; GALLEGUILLOS M.; DE LOS REYES M.; KOOYMAN DL.; ARANEDA S.; RAGGI L.** 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.* 74:193-9.

**PARRAGUEZ V.; ATLAGICH M.; ARANEDA O.; GARCÍA C.; MUÑOZ A.; DE LOS REYES M.; URQUIETA B.** 2011. Effects of antioxidant vitamins on newborn and placental traits in gestations at high altitude: comparative study in high and low altitude native sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 23:285-96.

**PARRAGUEZ V.; URQUIETA B.; PÉREZ L.; CASTELLARO G.; DE LOS REYES M.; TORRES-ROVIRA L.; AGUADO-MARTÍNEZ A.; ASTIZ S.; GONZÁLEZ-BULNES A.** 2013. Fertility in a high-altitude environment is compromised by luteal dysfunction: the relative roles of hypoxia and oxidative stress. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11:24.

**PARRAGUEZ VH.; DIAZ F.; COFRÉ E.; URQUIETA B.; DE LOS REYES M.; ASTIZ S.; GONZALEZ-BULNES A.** 2014. Fertility of a high-altitude sheep model is compromised by deficiencies in both preovulatory follicle development and plasma LH availability. *Reprod. Domest. Anim.* 49:977-84.

**RIZZO A.; ROSCINO MT.; BINETTI F.; SCIORSI RL.** 2012. Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reprod. Domest. Anim.* 47:344-52.

**SANTOS JM.; MENEZES VG.; BARBERINO RS.; MACEDO TJ.; LINS TL.; GOUVEIA BB.; BARROS VR.; SANTOS LP.; GONÇALVES RJ.; MATOS MH.** 2014. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-2 in the sheep ovary and its effects on pre-antral follicle apoptosis and development in vitro. *Reprod. Domest. Anim.* 49:522-8.

**SCOTTI L.; ABRAMOVICH D.; PASCUALI N.; IRUSTA G.; MERESMAN G.; TESONE M.; PARBORELL F.** 2014. Local VEGF inhibition prevents ovarian alterations associated with ovarian hyperstimulation syndrome. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 144:392-401.

**SEMENZA G.** 2011. Hypoxia-Inducible Factor 1: Regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta.* 1813:1263-8.

**SUGINO N.** 2006. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Anim. Sci. J.* 77:556–565.

**WEBB R.; WOAD KJ.; ARMSTRONG DG.** 2002. Corpus luteum (CL) function: local control mechanisms. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23:277-85.

**YANG MY.; RAJAMAHENDRAN R.** 2000. Morphological and biochemical identification of apoptosis in small, medium, and large bovine follicles and the effects of follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on spontaneous apoptosis in cultured bovine granulosa cells. *Biol. Reprod.* 62:1209-17.

**YU Y.; LI W.; HAN Z.; LUO M.; CHANG Z.; TAN J.** 2003. The effect of follicle-stimulating hormone on follicular development, granulosa cell apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin-like growth factor-I in the goat ovary. *Theriogenology.* 60:1691-704.

**ZHANG H.; BOSCH-MARCE M.; SHIMODA LA.; TAN YS.; BAEK JH.; WESLEY JB.; GONZALEZ FJ.; SEMENZA GL.** 2008. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 283:10892-903.