



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

EXPRESIÓN DE HIF-1 α EN PLACENTAS DE OVEJAS
ADAPTADAS Y NO ADAPTADAS A LA ALTURA:
EFEECTO DE LA TERAPIA ANTIOXIDANTE

ANA MARÍA RAMÍREZ KAMANN

Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias

Santiago-Chile
2012



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

SE INFORMA A LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO Y POSTÍTULO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS, QUE LA TESIS DE MAGÍSTER PRESENTADA POR LA CANDIDATA

ANA MARÍA RAMÍREZ KAMANN

HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS CON MENCIÓN EN PATOLOGÍA ANIMAL, EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DÍA 3 DE DICIEMBRE DE 2012

DIRECTOR DE TESIS

DR. VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ G.

COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS

DRA. MÓNICA DE LOS REYES S.

DR. JULIO LARENAS H.

**Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio de Fisiología del Departamento
de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Universidad de Chile
y contó con financiamiento de Proyecto Fondecyt 1070405**

DEDICATORIA

A mi esposo y mis hijos

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo representa el esfuerzo de años por lograr un objetivo. Distintas personas han estado a mi lado en este proceso a las que quisiera agradecer:

Al *Dr. Víctor Hugo Parraguez*, quien plasmó mediante su paciencia y experiencia el conocimiento necesario para enfrentar los desafíos.

A los *Drs. Mónica de los Reyes y Julio Larenas*, por su incansable apoyo, sus acertados consejos y su oportuna orientación.

A todos mis colegas del Departamento de Patología Animal, por el aprecio que siempre he recibido y apoyo constante. Al T.M. Sr. Miguel Sepúlveda por su invaluable colaboración en el procesamiento histológico de las muestras.

A mi querido y admirado *Dr. Wilhelm Rudolph* (Q.E.P.D), un profundo y sentido recuerdo en su memoria.

A mis colaboradoras del Laboratorio de Hematología, *María Evangelista Pérez y María de la Cruz Santibáñez*, y *Jaqueline Yévenes*, Secretaria del Departamento de Patología Animal, amigas incansables en su entusiasmo y ánimo en los momentos más complejos, cuando día a día me animaban a seguir adelante.

Finalmente, a mi maravillosa familia, mis padres *Gastón y Ligia*, mi esposo *Pedro* y mis hijos *Rosario y Pedro Pablo*, sin los cuales nada de esto tiene sentido. Representan mi vida y les agradezco cada minuto que me concedieron de lejanía, fuerza y paciencia.

INDICE

INDICE	7
RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	10
INTRODUCCIÓN.....	12
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	15
GENERALIDADES.....	15
EL MODELO OVINO.....	17
DESARROLLO DE LA PLACENTA.....	18
FACTORES ANGIOGÉNICOS Y DESARROLLO PLACENTARIO.....	21
FACTOR INDUCIDO POR HIPOXIA – HIF.....	23
ESTRÉS OXIDATIVO Y GESTACIÓN.....	25
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	30
OBJETIVO GENERAL.....	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
1. LUGAR Y ANIMALES.....	31
2. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	32
3. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA HIF-1 α	33
4. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES.....	34
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	35
RESULTADOS.....	36
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES.....	59
BIBLIOGRAFÍA.....	60

RESUMEN

El presente estudio se fundamenta en la hipótesis que la prevención del estrés oxidativo en gestaciones ovinas que cursan en un ambiente de altura, también previene la sobreexpresión de HIF-1 α que induce la angiogénesis placentaria.

Cuarenta ovejas criollas de segundo parto fueron separadas en cuatro grupos: originarias de baja altura que gestaron en su ambiente (BB), originarias de baja altura que gestaron en la altura (BA), originarias de la altura que gestaron a nivel del mar (AB), originarias de la altura que gestaron en su ambiente (AA). La mitad de cada grupo fue suplementado diariamente vía oral con 500 mg de vitamina C y 350 UI de vitamina E. A los 100 días de gestación se midieron gases sanguíneos y se extrajeron placentomas a fin de determinar la expresión y localización inmunohistoquímica del factor inducido por hipoxia (HIF-1 α).

Los resultados indicaron la presencia de inmunoreactividad a HIF-1 α en los grupos de animales tratados y no tratados con terapia antioxidante, con menor intensidad de expresión en el grupo tratado, sin modificar la localización de éste. Los controles negativos de la técnica no mostraron inmunoreactividad al factor. Los gases sanguíneos evidenciaron la presencia de un estado hipoxémico en los grupos de gestación en altura. Cada variable analizada en forma individual (origen, altura de gestación y administración de vitaminas), mostró diferencias significativas entre los grupos tratados y no tratados, siendo la administración de antioxidantes la variable que mostró las diferencias más significativas ($p \leq 0,001$). Los animales que presentaron la menor expresión del factor fueron los pertenecientes a los grupos con tratamiento antioxidante BAV y ABV, mientras que los grupos que presentaron la mayor expresión fueron animales sin tratamiento antioxidante BA y AB. En el grupo de corta exposición a la altura (BA) se observó el mayor efecto de la terapia antioxidante (BAV) en

relación a la expresión de HIF-1 α , mientras que el grupo originario de baja altura no mostró diferencias significativas entre los grupos tratados (BBV) y los no tratados (BB).

En conclusión, la administración de vitaminas antioxidantes disminuye la expresión de HIF-1 α , ayudando a contrarrestar los efectos del daño oxidativo producido por la exposición a hipoxia hipobárica de altura en gestaciones ovinas.

Palabras claves: hipoxia, placenta, HIF-1 α , antioxidante, ovinos.

SUMMARY

The present study evaluated the hypothesis that oxidative stress in ovine pregnancy at high altitudes can be prevented and also the overexpression of HIF-1 α as inductor of placental angiogenesis.

Fourty creole ewes were divided in four groups according to the altitude in which gestation occurred: low-native ewes maintained at low altitude (BB), low-native ewes maintained at high altitude (BA), high-native ewes maintained at low altitude (AB), high-native ewes maintained at high altitude (AA). Half of each group received daily oral supplements of vitamin C (500 mg) and E (350 UI). At 100 days of gestation blood gases were measured and placentomes were recovered for immunohistochemical evaluation of hypoxia inducible factor HIF-1 α .

Our results show positive immunoreactivity in all groups, with a lesser expression in the treated group and without changing the factor location. Controls were negative to the immunoreaction. Blood gases showed the presence of a hypoxemic state in the high altitude groups. The origin of the animals as well as the altitude in which gestation was carried out and the vitamin administration showed statistical differences in all groups, but the antioxidant therapy registered the most meaningful differences ($p \leq 0,001$). The BAV and ABV groups exhibit the lesser expression of HIF-1 α , whereas the respectively non treated groups (BA-AB) showed the mayor expression. In the new-coming altitude group (BA) we observed the mayor antioxidant therapy effect (BAV), whereas the low native group did not show any difference between the treated (BBV) and no treated animals (BB).

In conclusion, antioxidant supplementation diminishes the HIF-1 α expression helping to counteract the effects produced by oxidative damage in high altitude hypobaric hypoxia sheep pregnancy.

Key words: *hipoxia, placenta, HIF-1 α , antioxidant, ovine.*

INTRODUCCIÓN

La hipoxia de altura es un fenómeno atmosférico que afecta a las poblaciones humanas y animales que se establecen sobre los 2.500 m.s.n.m. La especie ovina es la única especie doméstica de interés pecuario introducida en la altura que ha logrado adaptarse y sobrevivir, constituyéndose en un aporte importante de la economía rural del altiplano (de Carolis, 1987). A pesar de ello, se han descrito diversos efectos de la hipoxia de altura sobre la función reproductiva, tanto en animales nativos de la altura como en los expuestos a ella sólo durante la gestación, como son, la baja fertilidad (Parraguez *et al.*, 2006a), la restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) (Parraguez *et al.*, 2005) y menores pesos al nacimiento y crecimiento postnatal (Parraguez *et al.*, 2004). En humanos se ha observado un aumento de la morbilidad neonatal presentando patologías derivadas de complicaciones al parto como asfixia, aspiración de meconio, circulación fetal persistente, hipoglicemia, hipotermia e hipocalcemia (Kramer *et al.*, 1990) y la posibilidad de adquirir enfermedades durante la vida postnatal, principalmente metabólicas y cardiopulmonares (Murphy *et al.*, 2006; Barker y Lackland, 2003; Gale *et al.*, 2002; Barker, 2001; Cock *et al.*, 2001; Law *et al.*, 2000, Barker *et al.*, 1993a, 1993b).

Las gestaciones ovinas de hembras adaptadas a ambientes de altura presentan modificaciones estructurales a nivel de la placenta, asociadas al mejoramiento en su capacidad de transferencia de oxígeno y nutrientes al feto, dentro de los que destacan, un incremento en el peso de la placenta junto con la disminución en el número de placentomas, aumento en la superficie de contacto materno-fetal y el incremento del lecho capilar placentario (Krebs *et al.*, 1997; Penninga y Longo, 1998; Parraguez *et al.*, 2006b). Estos cambios siguen la misma tendencia en hembras originarias de nivel del mar llevadas a gestar en altura, pero su magnitud es menor, ya que no logran compensar los efectos de

la hipoxia sobre el crecimiento fetal (Parraguez *et al.*, 2006 a,b). Estas observaciones se han visto modificadas positivamente al administrar dosis profilácticas de antioxidantes para compensar el efecto del estrés oxidativo que ocurre producto de la hipoxia hipobárica de altura (Parraguez *et al.*, 2006 a,b).

El crecimiento de la placenta depende del desarrollo vascular inducido por vasculogénesis y angiogénesis (Zygmunt *et al.*, 2003; Reynolds *et al.*, 2005b). Estos procesos están regulados por diversas moléculas como hormonas y factores de crecimiento, dentro de los cuales destacan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), ya que se ha demostrado que la elevación de su nivel se correlacionan positivamente con el volumen y peso placentario, tanto en humanos como en ovinos (Wheeler *et al.*, 1999; Reynolds y Redmer, 2001; Torry *et al.*, 2004). El VEGF promueve la vasculogénesis y la angiogénesis mediante la interacción con sus receptores VEGF-R1 y -R2 (Ferrara, 2000), mientras las Angiopoyetinas (ANG 1 y ANG 2) promueven sólo la angiogénesis (Carmeliet, 2000). En un ambiente hipóxico, la expresión local de VEGF es controlada por el Factor Inducible por Hipoxia tipo 1 α (HIF-1 α) (Wang *et al.*, 1995), que es el principal péptido involucrado en la adaptación a este tipo de condiciones (Semenza, 1999).

En consideración a que la vascularización y el tamaño de la placenta se incrementan en gestaciones de ovejas bajo condiciones de hipoxia de altura (Krebs *et al.*, 1997; Penninga y Longo, 1998; Parraguez *et al.*, 2006b) y que la magnitud de estos cambios se acentúan más en hembras nativas de la altura comparadas con aquellas nativas del nivel del mar llevadas a gestar a la altura (Parraguez *et al.*, 2006 a,b), es que el presente estudio examinará la expresión de HIF-1 α en placentas de ovejas expuestas durante periodos cortos y largos a la hipoxia hipobárica de altura, comparadas con aquellas cuyas gestaciones ocurren a nivel del mar. Adicionalmente, se establecerá el posible rol que tiene

la administración de dosis profilácticas de antioxidantes en la expresión de estos factores en ovejas expuestas a gestación de altura con diferentes tiempos de adaptación, dado el comprobado efecto de esta terapia en el incremento del peso al nacimiento en gestaciones desarrolladas en la altura.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

GENERALIDADES

El éxito en el establecimiento, mantención y término de la preñez con un recién nacido vivo y sano es la finalidad de la función reproductiva. Este proceso es uno de los más sensibles a los cambios medioambientales en los animales y humanos. Dentro del espectro de elementos que influyen, los factores climáticos directos (principalmente temperatura y fotoperiodo) o indirectos (disponibilidad de alimento) son los que tienen el mayor impacto (Jainudeen y Hafez, 2002).

Estudios efectuados en poblaciones humanas, han establecido que una mujer que se encuentra en su etapa reproductiva tiene sólo un 30% de probabilidades de concebir durante un ciclo menstrual y sólo el 50 a 60 % de esas concepciones son posibles de sobrevivir a las 20 semanas de gestación (Wilcox *et al.*, 1988). De las pérdidas estimadas, el 75% se puede atribuir a fallas en la implantación (Wilcox *et al.*, 1988). En un estudio realizado en Estados Unidos durante el año 2004, el 12,5% de los nacidos vivos fueron prematuros con un 8,1% de ellos bajo los 2.500 g (www.marchofdimes.com/peristats), lo que representa un aumento en la incidencia de bajos pesos al nacimiento del 11% desde el año 1994 en ese país y de un 15% en el mundo (www.unicef.org/publications).

En este contexto, la definición de bajo peso al nacimiento se refiere a individuos nacidos vivos con pesos inferiores a 2.500 g, pero también es posible definirlo como infantes con pesos ≤ 2 desviaciones estándar que el promedio de los normales (Barry y Anthony, 2008). Mediante técnicas de monitoreo prenatal se ha podido estimar que aproximadamente el 30% de los individuos con bajo peso al nacimiento fue producto de restricción del crecimiento

intrauterino (IUGR), es decir, infantes que fallaron en alcanzar su potencial genético de crecimiento *in utero* (Fang, 2005). Bajo peso al nacimiento, IUGR y nacidos prematuros están generalmente interrelacionados y la sumatoria de estas condiciones resulta en un incremento de la mortalidad y morbilidad infantil (Bernstein *et al.*, 2000; Resnik, 2002). Más aún, estudios epidemiológicos proveen evidencia sustancial de que las condiciones adversas ocurridas durante la preñez predisponen tempranamente en la vida adulta de estos individuos a enfermedad coronaria, diabetes, hipertensión e infarto (Barker, 1998).

El conocimiento del crecimiento y desarrollo del feto humano ha sido importante en los últimos 50 años (Pardi y Cetin, 2006). Sin embargo, persisten numerosas interrogantes en relación con la preñez humana, especialmente en aquellas que presentan las complicaciones antes mencionadas. Debido a razones tanto éticas como prácticas, diversos aspectos no pueden ser adecuadamente investigados, por lo que el uso de modelos animales es esencial en este aspecto (Pardi y Cetin, 2006). Todos los modelos animales utilizados, desde roedores hasta rumiantes domésticos, han aportado, pero algunas particularidades limitan su uso en las observaciones de la fisiología placentaria materna y fetal (Barry y Anthony, 2008). Aún cuando ningún modelo animal es exacto en reproducir este fenómeno, el modelo ovino ha sido durante los últimos 40 años de investigación el que mejor se adecua, debido a la facilidad para realizar procedimientos que han permitido obtener resultados repetibles y extrapolables a humanos cuando la tecnología ha estado disponible (Barry y Anthony, 2008).

Un ejemplo claro de esta interrelación es lo que ocurre en ambientes de altura, donde un problema ineludible en cualquier asentamiento humano o animal es la exposición a la hipoxia que acarrea implicancias en la función

reproductiva (Krampl, 2002). Existe una clara evidencia que el tiempo de residencia por varias generaciones en ambientes de altura impone una selección natural a la sobrevivencia de recién nacidos en esta condición (Moore *et al.*, 2004). La población humana que habita en las diferentes zonas de altura del planeta presenta una serie de trastornos asociados a esta condición, como son, cambios en la concentración espermática y disminución de la concentración plasmática de testosterona en hombres (Okumura *et al.*, 2003), mientras que en mujeres se describen cambios en el patrón esteroidogénico del ciclo sexual (Escudero *et al.*, 1996), aumento de los partos de pretérmino con evidencia morfológica de hipoxia placentaria (Reshetnikova *et al.*, 1996; Ali *et al.*, 1996) y disminución de la fecundidad (Abelson, 1976).

EL MODELO OVINO

Los ovinos son una especie productiva introducida en las tierras altas de Latinoamérica hace aproximadamente 500 años y desde el punto de vista reproductivo, se ha caracterizado por su baja eficiencia comparada con aquellas poblaciones ovinas establecidas a nivel del mar (de Carolis, 1987).

Desde una perspectiva biológica, el modelo ovino es esencial en el estudio de los fenómenos y variables fisiológicas asociadas a la gestación en humanos, como es el desarrollo placentario, que comienza tempranamente en la etapa embrionaria y continua durante toda la gestación mientras el incremento en el flujo sanguíneo va satisfaciendo las necesidades para el crecimiento del feto (Brosens *et al.*, 1967). Anatómicamente, de acuerdo a la clasificación de Grosser (1909), la placenta ovina es muy diferente a la placenta humana. Sin embargo, se describen importantes semejanzas en la función y estructuras funcionales entre ambas, como son la presencia de carúnculas y cotiledones, dispuestos a través de determinados lugares de la placenta ovina, mientras que en la placenta humana se disponen en toda la superficie de la

gran estructura discoide característica de esta especie (Steven, 1975). Las semejanzas observadas en la estructura de desarrollo vascular de la placenta ovina junto con la madurez del feto al nacimiento y la habilidad de obtener repetidas muestras de sangre materna y fetal durante un solo periodo de preñez, hacen de la oveja un modelo muy útil en el estudio del desarrollo vascular placentario y del intercambio de nutrientes (Meschia *et al.*, 1965; Battaglia *et al.*, 1968).

DESARROLLO DE LA PLACENTA

La placenta de los mamíferos es el órgano a través del cual todos los nutrientes, gases respiratorios y desechos son intercambiados entre los medioambientes materno y fetal. Así, el intercambio metabólico que el feto requiere para su crecimiento y desarrollo es posible y depende principalmente del flujo sanguíneo entre los lechos placentarios materno y fetal (Reynolds *et al.*, 2005 a,b). Sin embargo, en gestaciones de altura, tanto la placentación como el desarrollo placentario están fuertemente influenciados por la disminución de la presión parcial de oxígeno (Genbacev *et al.*, 1997), ya que la difusión del oxígeno al feto depende del flujo sanguíneo uterino y umbilical, de la capacidad de transporte de oxígeno y afinidad de la hemoglobina materno y fetal, de la superficie y permeabilidad placentaria y de la cantidad de oxígeno consumido por la placenta (Carter, 1989; Zamudio, 2003; Soma *et al.*, 2005).

El establecimiento de la red circulatoria placentaria y fetal es uno de los primeros eventos que ocurren durante el desarrollo embrio-fetal y debe ser capaz de responder a la creciente demanda del feto, especialmente durante la segunda mitad de la gestación (Ramsey, 1982). Los dramáticos cambios del lecho vascular placentario que resultan en un gran incremento tanto en la circulación sanguínea umbilical como uterina, están expuestos a que diversos factores que están directa o indirectamente relacionados tengan un gran

impacto en el desarrollo y crecimiento del feto, y por ende, en su supervivencia y crecimiento futuro (Alexander, 1974; Meschia, 1983; Reynolds y Redmer, 1995).

Barry y Anthony (2008) consideran que la placenta no es simplemente un transportador de hormonas y nutrientes, sino más bien un órgano metabólicamente activo que utiliza nutrientes, como glucosa, aminoácidos y oxígeno, acorde al crecimiento del feto, pero cuya demanda es incremental a medida que avanza la gestación. La capacidad de transferencia placentaria depende de un adecuado crecimiento y desarrollo y su finalidad es promover el crecimiento fetal hasta lograr su máximo potencial (Bell *et al.*, 1999; Wallace *et al.*, 1999). Diversos estudios indican que el punto crítico en este proceso es el incremento del flujo sanguíneo útero-placentario que en la oveja alcanza hasta 3 veces su volumen (0,4 a 1,2 L/min) en el último tercio de gestación (Konje *et al.*, 2003). Para esto se requiere también un incremento del lecho vascular de la placenta, que depende principalmente de los mecanismos de angiogénesis y neovascularización, los cuales permiten la instauración de una circulación fetal y placentaria funcionalmente efectiva desde el inicio de la gestación (Reynolds y Redmer, 1995; Magness, 1998; Charnock-Jones *et al.*, 2004; Kaufmann *et al.*, 2004; Reynolds *et al.*, 2005 a,b).

La formación de nuevos vasos sanguíneos ocurre mediante vasculogénesis y angiogénesis; ambos procesos están fuertemente regulados por promotores e inhibidores (Carmeliet *et al.*, 1996; Klagsbrun y D'Amore, 1991; Reynolds y Redmer, 1995) que son cruciales en la formación de la placenta y la mantención de la preñez. La *vasculogénesis* se define como una diferenciación *de novo* de células endoteliales derivadas de precursores mesodérmicos llamados angioblastos o hemangioblastos, los que representarían un tejido compuesto por células endoteliales embrionarias no

estructuradas, que una vez organizadas forman estructuras tubulares semejantes a una red de capilares (Risau y Flamme, 1995). Una vez que se ha constituido esta red vascular embriónica primaria, se comienzan a formar los nuevos capilares mediante *angiogénesis* a partir de la generación y ramificación de los brotes originados desde los capilares preexistentes o adyacentes (Risau, 1997; Kaufmann *et al.*, 2004).

La angiogénesis es un proceso determinante en el crecimiento y desarrollo de todo tejido normal (Hudlicka, 1984; Ferrara, 1996). Sin embargo, en individuos maduros, se limita a procesos de reparación tisular y órganos que llevan a cabo ciclos, como ocurre en el sistema reproductivo de la hembra donde el ovario y el endometrio son los tejidos blanco (Reynolds *et al.*, 1992). El rápido crecimiento y regresión de los tejidos reproductivos de la hembra se acompañan de cambios igualmente rápidos en sus lechos vasculares (Clark, 1900; Andersen, 1926; Bassett, 1943; Burr y Davies, 1951; Zheng *et al.*, 1993; Reynolds y Redmer, 1995; Redmer y Reynolds, 1996), donde las células endoteliales muestran índices mitóticos extremadamente elevados (Denekamp, 1984; Jablonka-Shariff *et al.*, 1993, 1994; Zheng *et al.*, 1994; Nicosia *et al.*, 1995; Christenson y Stouffer, 1996). De este modo y comparado con otros tejidos en un mismo individuo, el ovario, la placenta y el útero, son receptores de uno de los mayores índices de flujo sanguíneo, siendo esta extrema vascularización el reflejo de las altas demandas metabólicas que deben sortear (Bruce y Moor, 1976; Ellinwood *et al.*, 1978; Reynolds, 1986; Swann y Bruce, 1987; Keyes y Wiltbank, 1988; Reynolds *et al.*, 1992, 1994; Reynolds y Redmer, 1995; Redmer y Reynolds, 1996). Adicionalmente, la angiogénesis también ha sido descrita bajo condiciones patológicas, muchas de las cuales se encuentran relacionadas con fenómenos isquémicos e inflamatorios como sucede en cáncer, artritis reumatoidea y retinopatías, entre otras (Carmeliet y Jain, 2000).

FACTORES ANGIOGÉNICOS Y DESARROLLO PLACENTARIO

Una diversidad de factores angiogénicos han sido descritos en los procesos de vasculogénesis y angiogénesis. Estos incluyen al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), los factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs) y las familias de angiopoyetinas (ANG) y eNOS junto a sus respectivos receptores (Klagsbrun y D'Amore, 1991; Ferrara, 1996; Breier *et al.*, 1997; Hanahan, 1997; Neufeld *et al.*, 1999), entre otros.

El VEGF es un estimulador específico de permeabilidad vascular, así como también, de la producción y migración de proteasas celulares endoteliales, todos componentes críticos del proceso angiogénico (Folkman y Klagsbrun, 1987; Klagsbrun y D'Amore, 1991; Reynolds *et al.*, 1992; Ferrara y Davis-Smyth, 1997), lo que queda demostrado en ratones knock-out para ambos alelos de VEGF que resultan en un pobre desarrollo vascular y letalidad embrionaria, debido a las anomalías observadas en el feto y la placenta (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996). Estos autores concluyen no sólo que esta dependencia es absoluta, tanto para la angiogénesis placentaria como fetal, sino también que es requerido un umbral mínimo de expresión de este factor para que ocurra un desarrollo vascular normal.

Los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs) han demostrado ser potentes factores angiogénicos en estudios *in vivo* e *in vitro*, estimulando la proliferación de células endoteliales arteriales uterinas y fetales (Folkman y Klagsbrun, 1987; Klagsbrun y D'Amore, 1991; Zheng *et al.*, 1999; Cale *et al.*, 1997). Los FGFs son únicos dentro de los principales factores de crecimiento angiogénicos ya que son pleiotrópicos y su influencia no sólo es en la angiogénesis ya que también juegan un rol en otras funciones del desarrollo (Gospodarowicz, 1991). Por ejemplo, el FGF tipo 2 (FGF-2) es el mayor factor angiogénico del ovario, sin embargo, también estimula el crecimiento celular

folicular y luteal y la producción de progesterona luteal (Reynolds *et al.*, 2000; Grazul-Bilska *et al.*, 1995). Los FGFs promueven la sobrevivencia celular en una variedad de tejidos (Reynolds *et al.*, 2000; Tilly *et al.*, 1992; Yasuda *et al.*, 1995) y estimulan la diferenciación de las capas germinales embrionarias, especialmente el mesoderma (Slack *et al.*, 1987; Klein and Melton, 1994). Diversos autores han demostrado que FGF-2 es producido en los tejidos placentarios maternos y fetales durante toda la gestación describiéndose patrones específicos de expresión durante la etapa temprana y tardía de la gestación (Zheng *et al.*, 1998, 1995; Rider y Piva, 1998; Maddock *et al.*, 1999; Reynolds *et al.*, 1999), lo que ha llevado a proponer que los FGFs son factores amplificadores de la respuesta angiogénica del endometrio frente a la presencia de tejidos embrionarios, así como también, en la diferenciación de tejidos vasculares y no vasculares derivados del mesoderma (Reynolds *et al.*, 2000; Rider y Piva, 1998; Deng *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1994).

Las angiopoyetinas ANG-1 y ANG-2 por su parte, regulan el desarrollo y crecimiento vascular en sentidos opuestos, pero con un receptor común, Tie 2, presente principalmente en células endoteliales (Maisonpierre *et al.*, 1997). ANG-1 es un factor Tie 2 agonista que actúa remodelando, estabilizando y madurando los nuevos vasos que se están desarrollando, es quimiotáctico para las células endoteliales y potencia la acción del VEGF ya que estimula la interacción entre las células endoteliales y los pericitos (Suri *et al.*, 1998; Gale y Yancopoulos, 1999). Fisiológicamente, la ANG-1 promueve la angiogénesis induciendo la maduración y estabilización del vaso sanguíneo y en combinación con VEGF incrementan el diámetro luminal (Carmeliet, 2000). La ANG-2 promueve la desestabilización del vaso sanguíneo, mecanismo necesario para la formación de nuevos brotes y posterior ramificación que ocurre durante el proceso angiogénico (Maisonpierre *et al.*, 1997). En la placenta humana, la expresión de ANG-2 es mayor durante el primer trimestre de la gestación y

decrece a medida que ésta progresa (Goldman-Wohl *et al.*, 2000; Geva *et al.*, 2002).

Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que la hipoxia es un potente estimulador de angiogénesis ya que induce la expresión de factores de neovascularización en diversos tejidos, incluida la placenta (Shweiki *et al.*, 1992; Banai *et al.*, 1994; Shima *et al.*, 1995), mediante la acción del factor de transcripción inducido por hipoxia HIF-1 α , una proteína reguladora que gatilla una respuesta coordinada de angiogenesis (Forsythe *et al.*, 1996; Semenza, 1999). Desde el inicio del desarrollo placentario se observa un acelerado crecimiento, invasión y diferenciación de trofoblastos junto con un expansivo crecimiento de vasos sanguíneos maternos y fetales estimulado por un ambiente uterino hipóxico 3 – 5% O₂, versus lo normal fisiológico (normoxia) de aproximadamente un 8% (Cross *et al.*, 2002; Rinkenberger y Werb, 2000; McGrath *et al.*, 2003) lo que permite una adecuada expansión del lecho vascular, que en etapas tempranas de la gestación presenta una disponibilidad limitada (Carmeliet *et al.*, 1996; Ferrara *et al.*, 1996).

FACTOR INDUCIDO POR HIPOXIA – HIF

El sensor molecular más importante para detectar y responder a los cambios en la tensión de O₂ es una proteína heterodimérica llamada HIF (Factor inducido por hipoxia) (Adelman *et al.*, 2000; Maltepe *et al.*, 1997; Maltepe *et al.*, 2005).

HIF es un miembro de la familia de proteínas “basic helix-loop-helix PAS” y está compuesta de 2 subunidades, una alfa (HIF- α) y una beta (HIF-1 β), también llamada ARNT (“arylhydrocarbon receptor nuclear translocator”) (Semenza, 2000). Se han identificado 3 isoformas de HIF α : HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α (Kaelin y Ratcliffe, 2008). HIF-1 α y HIF-2 α son estructural y

funcionalmente similares, pero HIF-3 α no posee la estructura para transactivación en el COOH- terminal y podría estar involucrado en una función alternativa como un regulador negativo de la expresión de genes inducidos por hipoxia (Makino *et al.*, 2002).

Mediante activación transcripcional, HIF regula diversos procesos celulares en respuesta a hipoxia tales como angiogénesis, migración/invasión, eritropoyesis, metabolismo celular, proliferación/sobrevivencia celular, siendo un eje fundamental para la placentación (Adelman *et al.*, 2000; Corvello y Simon, 2004; Marx, 2004).

En la placenta, al igual que en otros tejidos, la actividad transcripcional de HIF está regulada por la abundancia de las subunidades alfa (HIF-1 α y HIF-2 α) y por la disponibilidad de oxígeno. Bajo condiciones de normoxia, las subunidades alfa son hidroxiladas mediante enzimas prolihidroxilasas (PDHs), lo que permite que sean reconocidas por el factor von-Hippel-Lindau (pVHL) para su posterior degradación proteosomal (Schofield y Ratcliffe, 2004; Yu *et al.*, 2001; Jaakkola *et al.*, 2001; Min *et al.*, 2002; Ivan *et al.*, 2001). En consecuencia, bajo normoxia los niveles celulares de HIF son muy bajos, debido a la degradación mediada por pVHL. Sin embargo, bajo condiciones de hipoxia, HIF-1 α y HIF-2 α no se hidroxilan, por lo que no son reconocidas por pVHL y por ende no son degradadas, lo que permite que se estabilicen (Maxwell *et al.*, 1999). HIF-1 α entonces, es traslocada al núcleo para formar un heterodímero con HIF-1 β , lo que estimula la transcripción de una serie de genes relacionados con la adaptación a estrés hipóxico-isquémico (Adelman *et al.*, 2000; Maltepe *et al.*, 2005; Bruick, 2003; Cowden *et al.*, 2005a,b).

Las PDHs pertenecen a una superfamilia de enzimas llamadas “sensores de oxígeno” y son fundamentales en la degradación de HIF- α ya que no

permiten que se establezca. Su actividad biológica está altamente regulada por la tensión de oxígeno (Kaelin y Ratcliffe, 2008) y la disponibilidad de hierro (Fe^{2+}) (Salnikow *et al.*, 2004). Se han identificado 3 isoformas (PDH1, PDH2, PDH3), cada una con su propia distribución tisular y subcelular (Kaelin y Ratcliffe, 2008; Metzner *et al.*, 2003). De todas, PDH2 es la más sensible como sensor de oxígeno, ya que disminuye considerablemente en hipoxia (Berchner-Pfannschmidt *et al.*, 2008). Aunque la hipoxia es una condición que reduce en su conjunto la actividad de las PDHs, se han descrito ciclos de regulación positiva de HIF- α que inducen la expresión de PDH2 y PDH3. Esto asegura una rápida remoción de HIF- α después de una reoxigenación (Berchner-Pfannschmidt *et al.*, 2008; Fong y Takeda, 2008).

La actividad de las PDHs es inhibida bajo condiciones de hipoxia (Berchner-Pfannschmidt *et al.*, 2008), presencia de óxido nítrico (Tug *et al.*, 2009) y especies reactivas de oxígeno (ROS) ya que estabilizan la actividad de HIF-1 α quelando y oxidando la unión a Fe^{2+} y gatillando la señal de activación de ROS en la mitocondria promoviendo estrés oxidativo (Chandel *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2007; Schroedl *et al.*, 2002). Adicionalmente, Wang *et al.* (2008) demostraron que bajo condiciones normales, la mitocondria lleva a cabo incrementos espontáneos de radical superóxido denominados “flashes de superóxido”. Estos flashes se han observado en todos los tipos celulares estudiados hasta ahora y son gatillados por acoples sorpresivos de la cadena transportadora de electrones y la membrana interna. Al reoxigenar luego del estado de hipoxia, se producen incrementos descontrolados del radical superóxido, lo que contribuye a exacerbar el estrés oxidativo.

ESTRÉS OXIDATIVO Y GESTACIÓN

El estrés oxidativo es un desbalance que ocurre entre la generación de especies prooxidantes (reactivas del oxígeno y del nitrógeno, ROS y RNS

respectivamente) y la capacidad de los antioxidantes de prevenir el daño oxidativo endógeno (Hubel *et al.*, 1989). Dentro de los efectos más importantes e inmediatos del estrés oxidativo se describen la peroxidación lipídica, que compromete la producción de ATP mitocondrial y estimula eventos proapoptóticos en la célula, la carbonilación o nitrosilación de proteínas, que alteran la conformación y función de las proteínas, y la acumulación de daño a nivel del DNA (Fattman *et al.*, 2003).

Como fue mencionado anteriormente, durante un estado de hipoxia, las células aumentan la producción mitocondrial de ROS lo que contribuye a incrementar el estrés oxidativo. La fuente primaria de generación de radicales libres en las células durante la hipoxia corresponde a la disminución del potencial redox de la cadena transportadora de electrones, principalmente a nivel del citocromo III, que causa el aumento de las ROS (Guzy y Schumacker, 2006). Además, se incrementa la liberación de radicales del O₂, mediante la activación de xantina oxidasa (Sohn *et al.*, 2003), NADPH oxidasa (Jones *et al.*, 2000) y de fosfolipasa A₂ (Neidlinger *et al.*, 2005) que junto a las ROS causan los efectos antes descritos.

Estudios realizados en humanos y animales a más de 3.000 m.s.n.m. sostienen que la sangre que ingresa en el espacio de la vellosoidad placentaria tiene una presión de oxígeno (pO₂) aproximadamente un 20% menor que la observada a nivel del mar, por lo que la perfusión sanguínea uterina y la disponibilidad de oxígeno se reducen en alrededor de un 33% (Zamudio, 2003). Esta exposición a la hipoxia hipobárica de altura incrementa los efectos causados por el estrés oxidativo (Pialoux *et al.*, 2006; Magalhaes *et al.*, 2005; Jefferson *et al.*, 2004; Dosek *et al.*, 2007). Al respecto, se han demostrado incrementos importantes de biomarcadores de estrés oxidativo en estados de preeclampsia, una complicación común de observar en preñeces patológicas

(Khalil y Granger, 2002; Myatt y Cui, 2004) y cuya incidencia es aproximadamente cinco veces más en gestaciones de altura (Palmer *et al.*, 1999; Keyes *et al.*, 2003). Recientemente, Parraguez *et al.* (2011), observaron estrés oxidativo en ovejas que desarrollaron su preñez en altura mediante el incremento plasmático de biomarcadores de daño oxidativo proteico y lipídico, especialmente en ovejas no adaptadas a la altura comparadas con aquellas nativas de la altura. Un efecto similar fue observado en humanos por Sinha *et al.* (2009).

Pialoux *et al.* (2009) corroboraron la hipótesis que las ROS regulan la expresión de HIF-1 α , encontrando correlaciones significativas entre marcadores de oxidación de DNA y expresión génica de HIF-1 α . Sin embargo, el mecanismo no está bien definido. Se han postulado dos modelos: el primero propone que las ROS inhiben las PDHs lo que permite la estabilización de HIF-1 α ya que no se hidroxila (Semenza, 2006); el segundo modelo asume que bajo hipoxia, la NADPH oxidasa derivada de ROS disminuye la acumulación de HIF-1 α y su efecto transcripcional posterior (Ehleben *et al.*, 1998). Lo propuesto por Semenza (2006) indicaría que bajo hipoxia moderada, la producción de ROS en la mitocondria es necesaria para inhibir completamente la hidroxilación de HIF-1 α y posteriormente estabilizar la proteína, lo que sugiere que las ROS serían coestimuladoras de la transcripción de HIF-1 α bajo esas condiciones.

Las ROS también pueden aumentar cuando existen bajas concentraciones de antioxidantes, tales como vitaminas A, C, E y cofactores metabólicos como glutatión y tioredoxina, o bien, cuando existe una disminución de enzimas antioxidantes (Sen, 2001; Vanderlelie *et al.*, 2005).

Las enzimas antioxidantes previenen el daño causado por los radicales libres y su regulación depende principalmente del estatus oxidativo de la célula.

El factor transcripcional que regula la expresión de genes antioxidantes y citoprotectores bajo hipoxia/estrés oxidativo, es el “nuclear factor-erythroid 2 p45-related factor 2” (Nrf2) (Kobayashi y Yamamoto, 2005; Nguyen *et al.*, 2003). Este factor activa la transcripción de enzimas como hemoxigenasa 1, glutatión peroxidasa 2, NAD(P)H-quinona oxidoreductasa 1 y glutatión S-transferasa (Kobayashi y Yamamoto, 2005; Nguyen *et al.*, 2003). Sin embargo, esta respuesta no siempre logra restablecer el balance redox.

Diversos estudios han demostrado que la administración de antioxidantes disminuyen significativamente los efectos causados por el estrés oxidativo (Landvik *et al.*, 2002; Chappel *et al.*, 2002; Subudhi *et al.*, 2006; Katavetin *et al.*, 2006; Zhao *et al.* 2007; Yoh *et al.*, 2008; Rosenberguer *et al.*, 2008; Parraguez *et al.*, 2011), ayudan a prevenir la enfermedad aguda de montaña (Bailey y Davies, 2001), y hay evidencia que serían altamente beneficiosos en la prevención de pre-eclampsia (Chappell *et al.*, 1999, 2002; Rodrigo *et al.*, 2005; Rumiris *et al.*, 2006).

Schmidt *et al.* (2002) utilizaron en humanos expuestos a altura y bajas temperaturas una combinación de antioxidantes compuestos por vitamina E, β caroteno, ácido ascórbico y selenio entre otros, que resultaron en una reducción del estrés oxidativo causado por la altura. Ilvazhagan *et al.* (2001) comprobaron este mismo fenómeno mediante la administración oral de un suplemento de vitamina E en ratas expuestas a altura donde disminuyó considerablemente la peroxidación lipídica que se observa en estos casos. Parraguez *et al.* (2011) demostraron que la suplementación con vitaminas C y E durante la etapa de gestación previene los efectos del estrés oxidativo en ovinos expuestos a hipoxia de altura.

En consecuencia, considerando que la hipoxia gatilla la expresión de factores de neovascularización en la placenta ovina (Parraguez *et al.*, 2010) y que de la expresión de estos factores depende tanto el tamaño como la vascularización de la placenta, además de que la magnitud de los cambios observados en la placenta son mayores en gestaciones en altura, se examinó la expresión del factor HIF-1 α , en ovejas gestantes nativas de altura comparadas con nativas de baja altura, cuyas gestaciones se desarrollan en ambiente hipobárico e hipóxico de altura y se estableció el efecto de la terapia antioxidante durante este período.

OBJETIVO GENERAL

Establecer el efecto de la hipoxia hipobárica de altura y de la administración de vitaminas antioxidantes sobre la placenta de ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura, en la expresión de HIF-1 α .

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar la expresión y localización placentaria de HIF-1 α en ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura durante gestaciones que cursan en ambiente hipóxico de altura.
2. Establecer el efecto de la administración de vitaminas C y E sobre la expresión y localización placentaria de HIF-1 α en ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura durante gestaciones que cursan en ambiente hipóxico de altura.

HIPÓTESIS

La prevención del estrés oxidativo en gestaciones ovinas que cursan en el ambiente hipóxico de altura, también previene la sobreexpresión de HIF-1 α , factor mediador de angiogénesis placentaria.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LUGAR Y ANIMALES:

Este protocolo fue diseñado acorde a la guía para el cuidado y uso de Animales Experimentales del Consejo Canadiense para el Cuidado Animal y las Normas de Eutanasia de la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (2007), y 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 40 ovejas criollas de segundo parto, 20 de las cuales eran originarias del Valle de Lluta a menos de 700 m.s.n.m. (18°23'08"S, 70°08'53"W), ubicado en la XV Región de Arica y Parinacota, cuyos ancestros llevan varias generaciones viviendo a esas alturas. Las restantes correspondieron a animales nacidos sobre los 3.500 m.s.n.m. en el altiplano de la XV región, con ancestros de varias generaciones viviendo a gran altura.

Las ovejas de cada grupo 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, 10 ovejas nativas de nivel del mar (BA) fueron trasladadas a las instalaciones del Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS) de la Universidad de Chile en la localidad de Putre (18°11'48"S, 69°33'11"W), donde cursaron la totalidad de su preñez junto a 10 ovejas nativas de altura (AA), hasta el día de la obtención de muestras. Luego del encaste y diagnóstico de gestación, un grupo de 10 ovejas nativas de la altura (AB) fue trasladado al Valle del Lluta para cursar su gestación junto a 10 ovejas del grupo nativo de baja altura (BB).

Todos los animales fueron alimentados diariamente con 2 kg/día/animal de heno de alfalfa (MS~90%, E~11 MJ/Kg, Prot~14%) dividido en dos raciones durante el día y agua a libre disposición, satisfaciendo así los requerimientos establecidos por el NRC (National Research Council, 1985) para la edad y condición fisiológica. Adicionalmente, 5 ovejas de cada grupo fueron suplementadas con 500 mg de vitamina C y 350 UI de vitamina E, administradas diariamente junto con el alimento, a partir de los 30 días antes del encaste y hasta el momento de la toma de muestras.

De esta forma se conformaron 8 grupos en total (n=5 cada uno) según el detalle que se muestra en la siguiente tabla:

TABLA N°1. Resumen grupos experimentales

BB	Ovejas nativas del nivel del mar (B) que gestan al nivel del mar (B) sin suplemento vitamínico
BBV	Ovejas nativas del nivel del mar (B) que gestan al nivel del mar (B) con suplemento vitamínico (V)
BA	Ovejas nativas del nivel del mar (B) que gestan en altura (A) sin suplemento vitamínico
BAV	Ovejas nativas del nivel del mar (B) que gestan en altura (A) con suplemento vitamínico (V)
AB	Ovejas nativas de altura (A) que gestan a nivel del mar (B) sin suplemento vitamínico
ABV	Ovejas nativas de altura (A) que gestan a nivel del mar (B) con suplemento vitamínico (V)
AA	Ovejas nativas de altura (A) que gestan en altura (A) sin suplemento vitamínico
AAV	Ovejas nativas de altura (A) que gestan en altura (A) con suplemento vitamínico (V)

2. 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. Inmediatamente luego de la inducción anestésica, se tomó una muestra de sangre de la arteria carótida izquierda (1 mL) para la medición de P_aO_2 (Presión parcial de oxígeno), P_aCO_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.). Posteriormente, se realizó una laparotomía media infraumbilical para el abordaje del útero. Luego del sacrificio del feto y de la madre con sobredosis del anestésico, se procedió a realizar la instalación de catéteres en la arteria uterina y vasos umbilicales. 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. A continuación se perfundieron 4 L de Paraformaldehído al 4% en tampón fosfato, para lograr la fijación de las muestras. Una vez finalizado este proceso, se procedió a la extracción de la totalidad de los placentomas ya limpios y fijados. Tres placentomas del tipo A (morfología cóncava con tejido materno circundando el tejido fetal) (Vatnik *et al.*, 1991; Penninga y Longo, 1998), fueron separados, divididos en mitades y postfijados en la misma solución fijadora durante 12 horas a T^o ambiente para su posterior utilización en inmunohistoquímica.

3. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA LA EXPRESIÓN DE HIF-1A:

El procesamiento de las muestras fue realizado de acuerdo a Yee *et al.* (2003) y estandarizada para HIF-1 α :

Cada muestra obtenida se incluyó en parafina, para obtener cortes transversales de 5 μ m. Estos fueron montados en portaobjetos previamente silanizados para su posterior procesamiento, mediante inmunohistoquímica. De cada placentoma se obtuvieron 3 cortes transversales intercalados de la zona media. 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 mediante pretratamiento de 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. Para la inmunolocalización de HIF-1 α se utilizó un anticuerpo primario monoclonal purificado de ratón (TMAbcam Inc., USA, HIF-1 α antibody [H1alpha67](ab1) en dilución de 1:100 en TBS (Buffer Tritón x100 fosfato pH 7,7 www.abcam.com/technical), conteniendo 1% de BSA. Los cortes fueron incubados durante toda la noche a 37°C en cámara húmeda, con el anticuerpo primario. Los controles fueron mantenidos durante este mismo lapso en la solución de TBS en ausencia del anticuerpo primario. A continuación se realizó una incubación con el anticuerpo secundario, en una dilución de 1:200 en TBS BSA 1% por 90 minutos a 37°C. El anticuerpo secundario utilizado para HIF-1 α fue biotinilado de conejo anti-IgG de ratón (TMAbcam Inc., USA, Mouse IgG secondary antibody - H&L (ab6728)). Las muestras fueron incubadas con estreptavidina por 60 minutos, para luego proceder al revelado con el cromógeno DAB (TMDAB Impact, USA). A los 5 minutos la reacción fue detenida mediante la adición de Buffer TBS y lavado con agua destilada. Finalmente, los cortes ya procesados fueron deshidratados y montados para su posterior análisis por microscopía de luz.

4. OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES PARA LA EXPRESIÓN DE HIF-1A:

De cada corte se obtuvieron imágenes al azar, las que fueron fotografiadas mediante un sistema de captura y análisis de imágenes acoplado a un microscopio óptico con aumento de 400 x (Leica Application Suite© versión 1.8.0, Leica Microsystems, Switzerland). Se fotografiaron 10 campos por corte,

conteniendo tejido placentario materno y fetal. Cada imagen obtenida fue estandarizada previamente de acuerdo a luminosidad, contraste y tiempo de exposición. De cada campo se obtuvieron 6 áreas al azar para realizar una semicuantificación de la expresión del factor mediante el estudio de la densidad óptica (D.O.) de la inmunotinción utilizando el programa "Image J" (NIH, programa a libre disposición, <http://www.imagej.nih.gov/ij/>). Los resultados de D.O. fueron expresados como porcentaje del grupo control de expresión del factor que correspondió al grupo BB sin vitamina.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

Los resultados fueron analizados mediante un ANDEVA (Análisis de Varianza) factorial para establecer los efectos del origen, la altura donde se desarrolló la gestación y de la terapia antioxidante, así como sus interacciones. Cuando hubo efectos significativos se realizó la prueba de Duncan para establecer cuáles grupos son los que explican esas diferencias. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$. Los resultados fueron expresados como $X \pm D.E.$ Se utilizó el programa estadístico InfoStat® (Di Rienzo *et al.*, 2008).

RESULTADOS

Efecto de la hipoxia hipobárica y de la administración de antioxidantes sobre los gases sanguíneos arteriales y variables hematológicas.

La TABLA N^o2 muestra los resultados obtenidos de las mediciones de gases sanguíneos. Las mediciones de gases arteriales mostraron un estado hipoxémico en todos los grupos de animales con gestación en altura. Los niveles de P_aO_2 fueron más elevados en ambos grupos de altura tratados con vitaminas ($p < 0,05$).

Tabla N^o2. Gases sanguíneos y variables hematológicas medidos en arteria carotídea en ovejas que cursan su gestación (edad gestacional ~ 100 días) en la altura y a nivel del mar, con y sin administración de vitaminas C y E. Letras distintas indican diferencias significativas entre grupos.

Grupo	P_aO_2 (mmHg)	P_aCO_2 (mmHg)	Ht (%)	Hb (mg dL ⁻¹)	S_{Hb} (%)	pH
AA	53,0±1,2 ^c	23,8±0,9 ^b	32,2±0,7 ^{bc}	12,5±0,5 ^b	82,6±2,8 ^b	7,510
AAv	60,4±1,3 ^b	25,8±0,9 ^b	33,3±0,7 ^{bc}	12,9±1,1 ^b	85,9±3,9 ^b	7,458
BA	49,5±1,4 ^c	25,0±1,0 ^b	35,0±0,7 ^a	14,3±0,4 ^a	77,5±3,4 ^c	7,497
BAv	58,8±1,4 ^b	25,4±1,0 ^b	33,2±0,8 ^{a,b}	13,4±1,4 ^{a,b}	85,5±3,2 ^b	7,474
AB	97,6±1,3 ^a	40,8±1,2 ^a	30,6±1,0 ^d	11,1±0,5 ^c	98,2±1,9 ^a	7,459
ABv	97,9±1,8 ^a	40,1±1,2 ^a	31,1±1,4 ^{c,d}	10,9±1,2 ^c	98,5±2,3 ^a	7,468
BB	95,9±1,6 ^a	39,2±1,1 ^a	28,3±0,8 ^d	10,5±0,6 ^c	96,8±2,0 ^a	7,482
BBv	98,3±1,6 ^a	40,3±1,2 ^a	30,5±0,9 ^{c,d}	10,9±0,7 ^c	98,2±2,2 ^a	7,495

Los niveles de P_aCO_2 fueron más bajos en las ovejas que gestan en altura comparadas con las que gestan a nivel del mar ($p < 0,05$). La P_aCO_2 no mostró

una diferencia significativa entre los grupos de animales que gestan en la altura, por lo que la administración de vitaminas no tiene efecto en sus niveles plasmáticos. Las concentraciones de Hemoglobina (Hb) y el Hematocrito (Ht) fueron superiores en las gestaciones en altura ($p < 0,05$). El Ht tiende a aumentar con la suplementación vitamínica, pero no es estadísticamente significativo. Respecto de la Hb, se observa una interacción entre el origen de los animales y la administración de vitaminas ($p < 0,05$), mientras que el Ht se ve afectado además por la altura en la que se desarrolló la gestación ($p < 0,05$). Los valores de saturación de la hemoglobina por oxígeno (S_{Hb}) fueron menores en los grupos de altura, siendo el grupo BA el que presentó los más bajos ($p < 0,05$). El pH fue la única variable que no evidenció diferencias significativas entre los grupos.

Efecto de la hipoxia hipobárica y de la administración de antioxidantes sobre la presencia y localización placentaria de HIF-1 α .

Los resultados de la reacción inmunohistoquímica mostraron presencia de HIF-1 α en los placentomas de todos los grupos analizados. Los controles fueron negativos a la inmunoreactividad a HIF-1 α (imagen A).

En la figura 1 se observa una distribución homogénea de inmunoreactividad a HIF-1 α en los grupos de animales tratados (imagen C) y no tratados (imagen B) con terapia antioxidante, visualizada en color café debido al cromógeno DAB. La ubicación se observó tanto en las células del estroma como en los endotelios vasculares de todos los grupos positivos a la reacción.

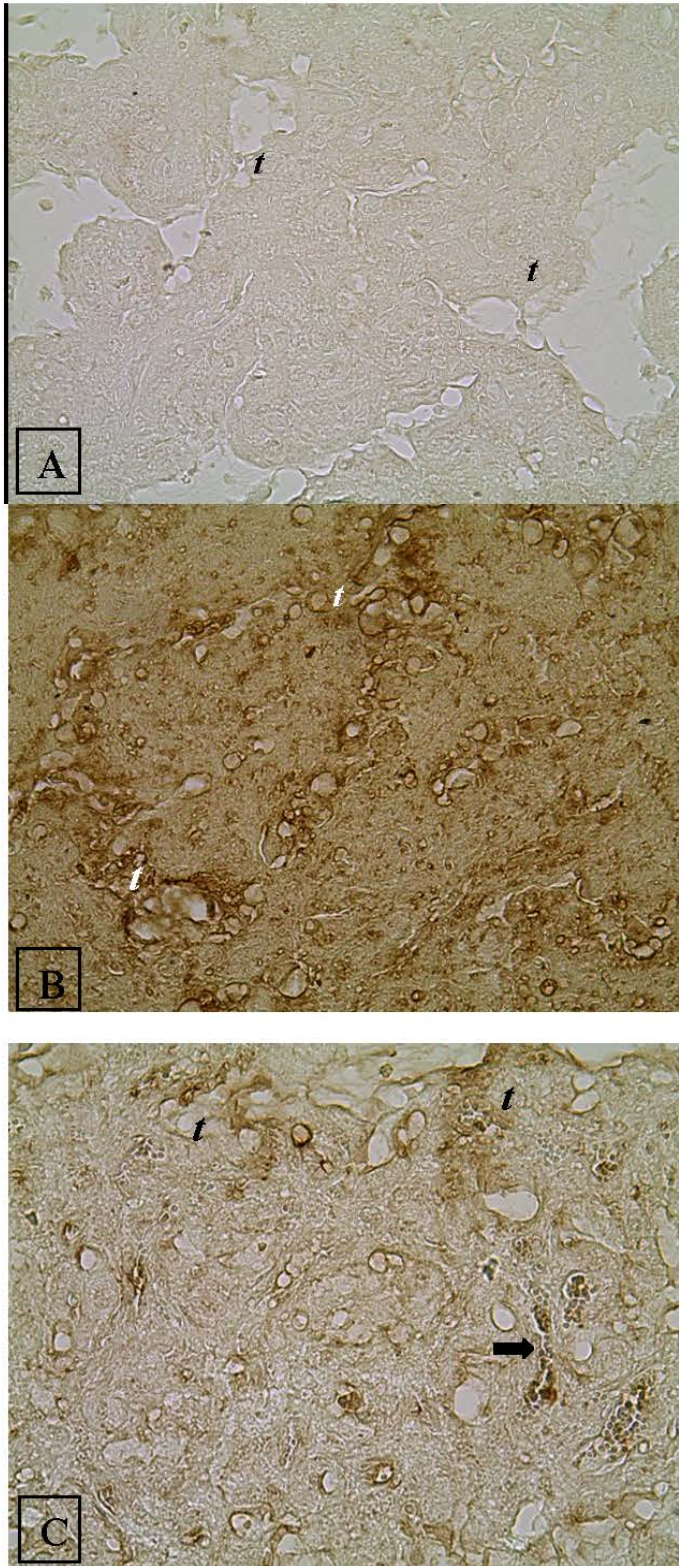


Figura 1

Imágenes representativas de inmunoreactividad a HIF1- α en placenta de ovejas de 100 días de gestación, cuya preñez se desarrolló a nivel del mar y a 3.600 m.s.n.m. con y sin terapia antioxidante. Aumento 400x. (A) control negativo, (B) gestación en altura sin vitamina, (C) gestación en altura con vitamina. "t" trofoblasto; \rightarrow capilar sanguíneo.

En el grupo de animales no tratados con vitamina (imagen B), las zonas ocupadas por células epiteliales maternas y células citotrofoblásticas presentan la mayor intensidad de inmunoreacción a HIF-1 α . El tejido adyacente al trofoblasto muestra una intensidad menor, pero más intensa en las zonas maternas que fetales. El grupo de animales tratados con terapia antioxidante (imagen C) se observa positivo a HIF-1 α , pero con menor intensidad, aún cuando la distribución del factor es similar a la descrita en el grupo de ovejas no tratadas (imagen B), es decir, en el área ocupada por las células epiteliales maternas y en muy menor intensidad las células citotrofoblásticas. El tejido adyacente al trofoblasto se observa escasamente positivo a la presencia del factor, pero siempre más intenso en las zonas maternas que fetales.

Expresión inmunohistoquímica de HIF-1 α .

Origen

Al considerar individualmente cada uno de las fuentes de variación estudiadas, se observó (Figura 2) que el lugar de origen de las ovejas (altura/nivel del mar) tuvo un efecto significativo ($p \leq 0,001$) para la expresión inmunoreactiva de HIF-1 α . En este caso, las ovejas nativas de la altura presentaron un 28% más de inmunoreactividad a HIF-1 α en comparación con las nativas del nivel del mar.

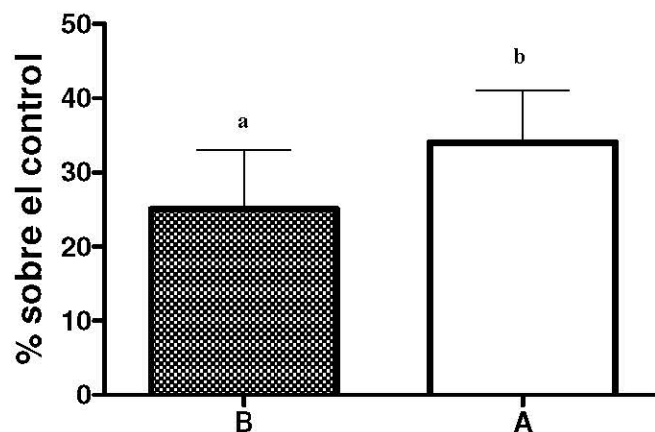


Figura 2: Comparación de la expresión inmunohistoquímica de HIF-1 α en placentas de ovejas de 100 días de gestación según origen. Letras distintas indican diferencias significativas entre las columnas.

B: ovejas nativas de nivel del mar; **A:** ovejas nativas de altura.

Altura de Gestación

La altura de gestación (altura/nivel del mar) fue un factor cuyo efecto también fue significativo ($p \leq 0,001$) para la expresión inmunoreactiva de HIF-1 α . Es así como, las ovejas que gestaron en la altura presentaron un 9,7% más de inmunoreactividad a HIF-1 α en comparación con aquellas que gestaron a nivel del mar (Figura 3).

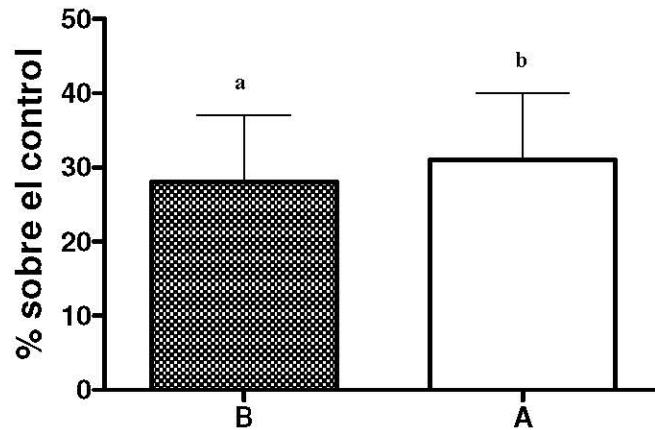


Figura 3: Comparación de la expresión inmunohistoquímica de HIF-1 α en placentas de ovejas de 100 días de gestación según altura de gestación. Letras distintas indican diferencias significativas entre las columnas.

B: ovejas con gestación a nivel del mar; **A:** ovejas con gestación en altura.

Administración de Vitaminas

La terapia antioxidante también destacó por su efecto altamente significativo ($p \leq 0,001$) en la expresión inmunoreactiva de HIF-1 α . Aquellos grupos donde se administró vitaminas antioxidantes se observa una disminución significativa en la expresión de HIF-1 α comparados con aquellos grupos que no recibieron la terapia antioxidante (Figura 4). Así, las ovejas que recibieron vitaminas presentaron un 38% menos de inmunoreactividad a HIF-1 α en comparación con aquellas ovejas a las cuales les fue administrada la terapia.

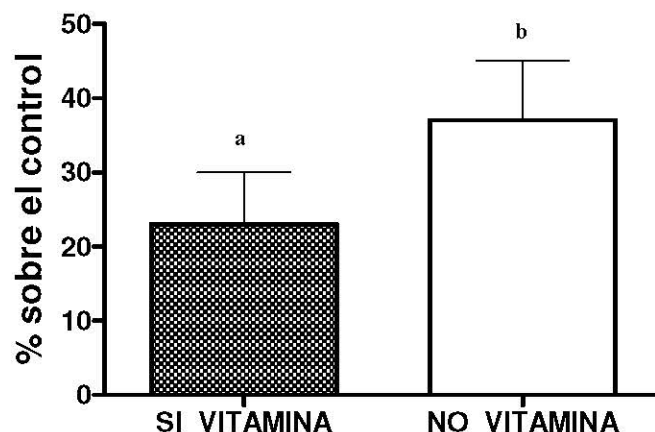


Figura 4: Comparación de la expresión inmunohistoquímica de HIF-1 α en placentas de ovejas de 100 días de gestación según administración de vitamina. Letras distintas indican diferencias significativas entre las columnas. SI vitamina: con terapia antioxidante; NO vitamina: sin terapia antioxidante.

Origen y Altura de Gestación

Al analizar en conjunto los factores origen (altura/nivel del mar) y altura de gestación (altura/nivel del mar), se observó que se presentó una interacción significativa ($p \leq 0,001$) para la expresión inmunoreactiva de HIF-1 α (Figura 5). En este caso las ovejas cuyo origen es el bajo y que gestan en la altura (BA) presentaron un 23,3% más de inmunoreactividad a HIF-1 α en comparación con aquellas ovejas originarias del bajo que gestaron en el bajo (BB). Las ovejas cuyo origen es la altura y que gestan en la altura (AA) presentaron un 5,5% más de inmunoreactividad a HIF-1 α en comparación con aquellas ovejas originarias de altura que gestaron a nivel del mar (AB).

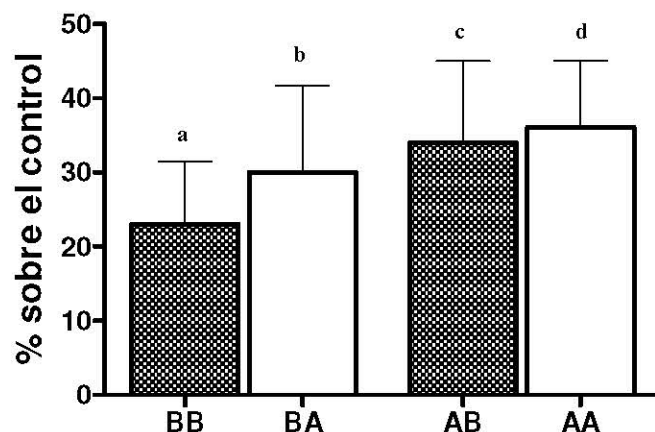


Figura 5: Comparación de la expresión inmunohistoquímica de HIF-1 α en placentas de ovejas de 100 días de gestación según origen y altura de gestación. Letras distintas indican diferencias significativas entre las columnas.

BB: ovejas nativas de nivel del mar que gestan a nivel del mar; **BA:** ovejas nativas de nivel del mar que gestan en altura; **AB:** ovejas nativas de altura que gestan a nivel del mar; **AA:** ovejas nativas de altura que gestan en altura.

Origen y Administración de Vitaminas

Al observar en conjunto los factores origen y administración de la terapia antioxidante el resultado no mostró una interacción significativa ($p= 0,667$) para la expresión inmunoreactiva de HIF-1 α ya que para ambos orígenes la administración de vitaminas causó una disminución de la expresión de HIF-1 α . En este caso, las ovejas cuyo origen es a nivel del mar y que reciben terapia antioxidante (B+vit) presentaron un 39,4% menos de inmunoreactividad a HIF-1 α en comparación con aquellas que no reciben la terapia (B). Las ovejas cuyo origen es la altura y que reciben terapia antioxidante (A+vit) presentaron un 31,7% menos de inmunoreactividad a HIF-1 α en comparación con aquellas ovejas originarias de la altura que no reciben la terapia antioxidante (Figura 6).

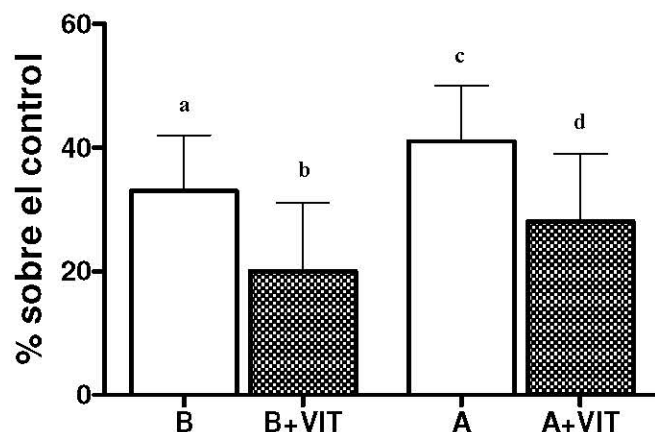


Figura 6: Comparación de la expresión inmunohistoquímica de HIF-1 α en placentas de ovejas de 100 días de gestación según origen y administración de vitamina. Letras distintas indican diferencias significativas entre las columnas.

B: ovejas nativas del bajo sin vitamina; **B+Vit:** ovejas nativas del bajo con vitamina; **A:** ovejas nativas de altura sin vitamina; **A+Vit:** ovejas nativas de altura con vitamina.

Altura de Gestación y Administración de Vitaminas

Si se analiza en conjunto la altura de gestación y la administración de vitamina, observamos que hay un efecto significativo ($p \leq 0,001$) para la expresión inmunoreactiva de HIF-1 α en todos los grupos (Figura 7). En este caso, las ovejas que gestan en el bajo con vitamina (B+vit) presentaron un 41,6% menos de inmunoreactividad a HIF-1 α en comparación con aquellas ovejas que gestan en el bajo sin vitamina (B). Las ovejas que gestan en la altura con vitamina (A+vit) presentaron un 26,3% menos de inmunoreactividad a HIF-1 α en comparación con aquellas ovejas que gestan en la altura sin vitamina (A).

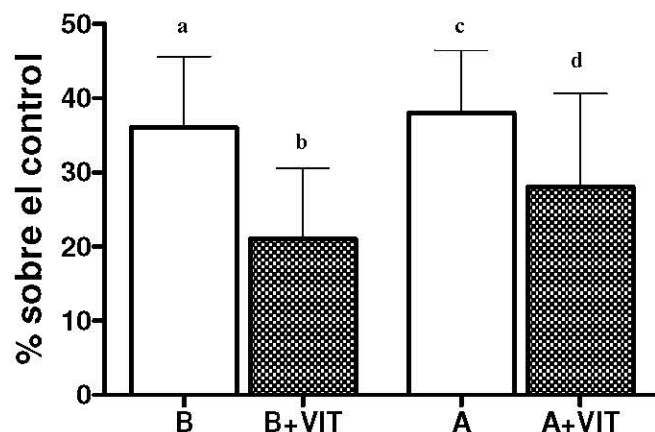


Figura 7: Comparación de la expresión inmunohistoquímica de HIF-1 α en placentas de ovejas de 100 días de gestación según altura gestación y administración de vitamina. Letras distintas indican diferencias significativas entre las columnas.

B: ovejas nativas que gestan en el bajo sin vitamina; B+Vit: ovejas que gestan en el bajo con vitamina; A: ovejas que gestan en altura sin vitamina; A+Vit: ovejas que gestan en altura con vitamina.

En términos de variables individuales, la administración de vitaminas representa el cambio más significativo en la expresión de HIF-1 α mientras que el origen de los animales se observó en segundo lugar. La altura de gestación fue la variable de menor cambio, pero su efecto es estadísticamente significativo.

Al considerar el origen de las ovejas y el lugar donde se desarrolla la gestación se observa un cambio mayor en la expresión de HIF-1 α cuando el origen de la oveja es a nivel del mar y la gestación es llevada a cabo en la altura (BA). Cuando el origen del animal es de altura y su gestación se desarrolla a nivel del mar la expresión del factor es menor (AB).

Origen, Altura de Gestación y Administración de Vitaminas

El análisis conjunto de resultados que considera el origen de los animales, la altura en la que gestan y la administración de terapia antioxidante presentó diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0,001$) entre todos los grupos no tratados con terapia antioxidante y aquellos con tratamiento, a excepción de los grupos BB-BBV y BAV-ABV respectivamente (Figura 8). El grupo de ovejas nativas de altura no suplementadas con vitaminas (AB) que gestan en el bajo fue el que presentó la mayor inmunoreactividad a HIF-1 α , mientras que la menor expresión se observó en los grupos BAV y ABV.

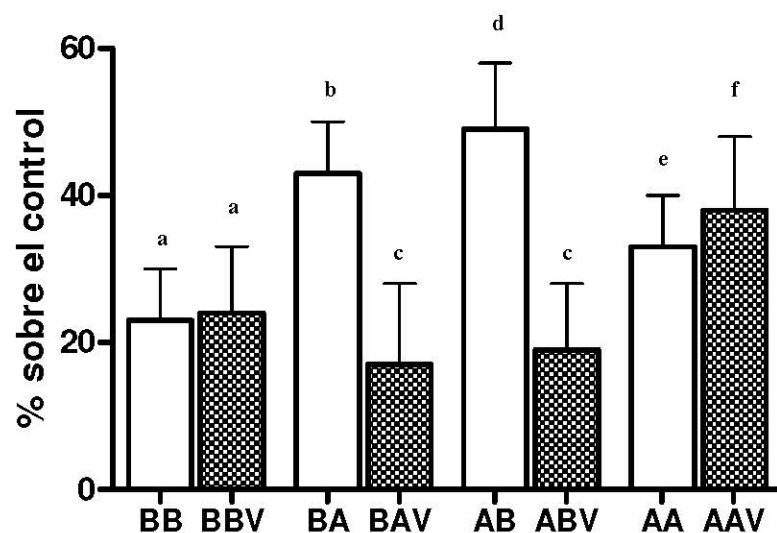


Figura 8: Comparación conjunta de la expresión inmunohistoquímica de HIF-1 α en placentas de ovejas de 100 días de gestación de grupos según origen, altura de gestación y terapia antioxidante. Letras distintas indican diferencias significativas entre las columnas.

BB: ovejas nativas de nivel del mar que gestan a nivel del mar sin vitamina; **BBV:** ovejas nativas de nivel del mar que gestan a nivel del mar con vitamina; **BA:** ovejas nativas de nivel del mar que gestan en altura sin vitamina; **BAV:** ovejas nativas de nivel del mar que gestan en altura con vitamina; **AB:** ovejas nativas de altura que gestan en a nivel del mar sin vitamina; **ABV:** ovejas nativas de altura que gestan a nivel del mar con vitamina; **AA:**

ovejas nativas de altura que gestan en altura sin vitamina; AAV: ovejas nativas de altura que gestan en altura con vitamina.

Los grupos de animales que presentaron la menor expresión del factor fueron los pertenecientes a los grupos con tratamiento antioxidante BAV y ABV, mientras que los grupos que presentaron la mayor expresión fueron animales sin tratamiento antioxidante AB y BA. En ambas situaciones se destaca la condición de origen y altura de gestación cuya diferencia radica en el aporte de terapia antioxidante.

Al considerar los efectos conjuntos observamos que la altura en que se desarrolla la gestación y la administración de vitaminas tienen los cambios más significativos en la expresión de HIF-1 α dado principalmente por el efecto de la terapia antioxidante.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se determinó la expresión y localización inmunohistoquímica de HIF-1 α en placentomas de ovejas de 100 días de gestación nativas de altura y de nivel del mar, cuyas gestaciones cursaron en ambientes normóxicos (nivel del mar) e hipóxicos de altura (3.500 m.s.n.m), y el efecto que la suplementación vitamínica antioxidante tiene bajo estas condiciones. Este es el primer estudio de la expresión de HIF-1 α en placentas de ovejas que gestan bajo condiciones de hipoxia hipobárica de altura. Estudios previos, han descrito la expresión de HIF-1 α en placentas ovinas, pero bajo condiciones de normoxia y en etapas tempranas del desarrollo gestacional (Grazul-Bliska *et al.*, 2010).

El estado hipoxémico observado en las gestaciones que se llevaron a cabo en la altura durante el presente estudio, se confirma mediante los resultados obtenidos en los gases sanguíneos, que concuerdan con los observados previamente (Parraguez *et al.*, 2010, 2011). El efecto directo de este estado se vio reflejado en la disminución de la P_aO_2 y S_{Hb} de los grupos que gestaron en la altura, en especial del grupo de corta exposición (BA). Sin embargo, los incrementos significativos observados en ambos parámetros cuando se administró terapia de vitaminas antioxidantes, sugieren que esta suplementación otorgaría un efecto protector a la función pulmonar durante el estado hipóxico. El daño pulmonar y las alteraciones en el intercambio gaseoso producidos por el estrés oxidativo han sido demostrados previamente (Tuder *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009), así como también, que la administración de antioxidantes disminuye importantemente la concentración sanguínea de marcadores de estrés oxidativo incrementando el estado antioxidante del organismo (Uzun *et al.*, 2006). De este modo los cambios observados en las concentraciones de gases sanguíneos y saturación de hemoglobina en

aquellos animales a los cuales les fue administrada terapia, sugieren que hubo una mejor oxigenación de los tejidos placentarios compensando el efecto de la hipoxia hipobárica de altura.

La placenta ovina es altamente susceptible a factores estresantes de naturaleza ambiental, tales como la hipoxia de altura (Parraguez *et al.*, 2006a), nutrición deficiente (Vonnahme *et al.*, 2003) y altas temperaturas (Galan *et al.*, 1999), entre otros. Estudios previos han demostrado que la respuesta compensatoria al estrés hipóxico se caracteriza por el aumento en el peso de la placenta y diámetro de los cotiledones, el aumento de la superficie placentaria y área vascular, y la disminución del número de cotiledones por placenta (Parraguez *et al.*, 2005). Los cambios placentarios asociados a la hipoxia hipobárica de altura se producen en virtud de la sobreexpresión de factores proangiogénicos como VEGF, Leptina y eNOS (Parraguez *et al.*, 2010), condición que es mediada por el factor inducible por hipoxia HIF-1 α . Los resultados de inmunolocalización obtenidos en nuestro estudio muestran la presencia de HIF-1 α en todos los grupos de ovejas analizados con y sin terapia antioxidante, incluidos los grupos mantenidos en normoxia. El sitio de mayor expresión correspondió a la zona ocupada por células epiteliales maternas y células citotrofoblásticas de las vellosidades fetales, lugar en que se produce la interdigitación de la placenta fetal y materna. Esta localización es consistente con lo descrito en referencia a la edad gestacional, ya que la expresión de factores proangiogénicos se hace más evidente en etapas avanzadas de la preñez (Bogic *et al.*, 2000; Cheung y Brace, 1998; Matsumoto *et al.*, 2002), así como también la mayor producción y secreción de hormonas y factores de crecimiento fetales (Zheng *et al.*, 2000). Sin embargo, en aquellos grupos de animales que gestaron bajo condición de altura, pero les fue administrada la terapia de antioxidantes, disminuyó considerablemente la expresión de HIF-1 α , especialmente en el grupo de corta exposición (BAV), lo que es consistente con lo sugerido por Parraguez *et al.*

(2011) en relación al efecto que las vitaminas antioxidantes tendrían en la angiogénesis placentaria y sus mecanismos de regulación. Cabe destacar que la localización observada en el tejido placentario para HIF-1 α no tuvo modificaciones al comparar los grupos suplementados con los que reciben la terapia, por lo que es posible sugerir que la hipoxia no modificaría la localización de HIF-1 α sino la magnitud de la expresión del factor.

Durante el primer tercio de gestación, la placenta inicia su desarrollo en un ambiente con menor tensión de oxígeno, situación que fisiológicamente es normal y necesaria. Sin embargo, cuando esto ocurre en etapas más avanzadas de la gestación es patológico y trae diversas consecuencias (Pringle *et al.*, 2010). El rol que HIF-1 α tiene como sensor de hipoxia durante el desarrollo y establecimiento de la preñez, se caracteriza por la estimulación de angiogénesis y vasculogénesis, procesos que son mediados por varias hormonas y factores de crecimiento, tanto en humanos como animales (Bogic *et al.*, 2000; Cheung *et al.*, 1995; Cheung y Brace, 1998; Reynolds *et al.*, 2005b; Zamudio 2003; Zygmunt *et al.*, 2003). La estimulación transcripcional mediada por HIF-1 α (Lee *et al.*, 2004), se caracteriza porque la subunidad α no se hidroxila bajo condiciones de baja presión de oxígeno lo que permite su migración al núcleo y posterior transcripción de genes encargados de regular el desarrollo vascular de la placenta (Fryer y Simon, 2006; Moore *et al.*, 2004). Nuestros resultados confirman la presencia de HIF-1 α en los placentomas de todos los grupos de ovejas gestantes incorporados en este estudio, independiente de su origen, lugar de gestación y administración de vitaminas antioxidantes. Sin embargo, también observamos una sobreexpresión del factor en aquellos grupos cuyas gestaciones se desarrollaron en la altura, especialmente cuando las hembras son originarias del bajo y gestan en la altura (BA) y una disminución de la expresión del factor cuando se administró antioxidantes (BAV).

Una posible explicación es que en el transcurso de la gestación, el metabolismo materno y fetal se encuentra muy incrementado, más que en cualquier otro estado fisiológico, debido a la intensa actividad mitocondrial, cuya consecuencia directa es el incremento en los niveles de elementos oxidantes, como el anión superóxido, peróxido de hidrógeno, peróxidos lipídicos y radicales libres, especialmente en las etapas finales (Aurousseau *et al.*, 2004). Este estado de estrés oxidativo durante la gestación es contrarrestado por diferentes mecanismos conducentes a aminorar sus efectos nocivos e incrementar los beneficiosos, en virtud de un adecuado desarrollo placentario y fetal, dado principalmente por un apropiado flujo sanguíneo umbilical (Pringle *et al.*, 2010). Uno de los factores importantes en la mantención de este flujo es el Óxido Nítrico (ON) producido en las células endoteliales vasculares y que tiene una alta afinidad por las ROS, especialmente el anión superóxido ($O_2\cdot^-$) (Droge, 2002), lo que implica que bajo una elevada concentración de ROS, disminuye rápidamente la biodisponibilidad de ON. Paralelamente, existen otras moléculas que también son afines a estos radicales libres, como son la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Fridovich, 1978), con afinidad semejante al ON, y antioxidantes como vitamina C y melatonina, que en dosis elevadas pueden competir efectivamente por el $O_2\cdot^-$ manteniendo así una buena biodisponibilidad de ON (Gotho y Niki, 1992). Los mecanismos mediante los cuales estos metabolitos cumplen esta función son diversos. Entre estos podemos destacar su acción directa en la disminución de las ROS y prevención de la inactivación de enzimas antioxidantes como SOD (Jackson *et al.*, 1998), incremento de las concentraciones de ON (Ignarro *et al.*, 1993) y estabilización de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y otros cofactores (Geetha y Shyamala, 1989). Durante el estado hipóxico, HIF-1 α estimula la síntesis de isoformas de NOS, incrementándose la producción de ON (Illsley *et al.*, 2010).

Las ROS son también consideradas sensores de oxígeno ya que promueven la estabilización de HIF-1 α (Brunelle *et al.*, 2005), tanto en normoxia como en hipoxia, pero en esta última, se observa concomitante a un incremento de estrés oxidativo, una falta de capacidad antioxidante total, lo que sugiere que este balance se ve inclinado hacia una mayor producción de ROS (Pialoux *et al.*, 2009). De acuerdo a lo propuesto por Semenza (2006), bajo condiciones de hipoxia moderada, la producción de ROS es necesaria para inhibir la hidroxilación de HIF-1 α y así estabilizar la proteína generando la transcripción de genes asociados angiogénesis y vasculogénesis, pero bajo condiciones de hipoxia severa, se observa un desbalance hacia un estado de estrés oxidativo mayor, lo que genera una sobreexpresión de este factor. Zhao *et al.* (2007) describieron en células hipóxicas de arteria pulmonar de rata una disminución del HIF-1 α RNAm luego de administrar antioxidantes. Estos datos, junto con los obtenidos por Pialoux *et al.* (2009), sugieren que las ROS también regularían la expresión y transcripción de HIF-1 α . A la luz de nuestros resultados, es concordante con lo observado en el grupo nativo de altura (AA) ya que, aun cuando hay una sobreexpresión del factor, ésta sería producto de uno de los mecanismos sugeridos de reprogramación metabólica en relación con la disminución del consumo de oxígeno mitocondrial a través del incremento de la biodisponibilidad de ON y el mejor desarrollo de lecho vascular en desmedro del crecimiento fetal (Illsley *et al.*, 2010). El grupo nativo de altura que gesta en su ambiente (AA), mostró resultados opuestos al ser comparado con el grupo que recibe vitamina (AAV) donde la terapia incrementó la expresión inmunohistoquímica de HIF-1 α . Este resultado no es concordante con lo sugerido por Parraguez *et al.* (2011) en relación con la administración de vitaminas antioxidantes, ya que ha demostrado ser beneficiosa en contrarrestar los efectos de la hipoxia en relación con las características y función de la placenta. En este caso es posible que la terapia haya activado o inhibido factores reguladores que actúan en la adaptación al estado hipóxico crónico. En

la actualidad, la evidencia apunta a diferentes respuestas que ocurren en la placenta frente a una prolongada exposición a hipoxia comparado con situaciones de exposición aguda, pero las investigaciones al respecto no permiten concluir claramente los mecanismos involucrados (Pringle *et al.*, 2010). Estudios realizados en placentas humanas en altura señalan que sus perfiles metabólicos muestran claros efectos de adaptación a hipoxia crónica, basados en el análisis de marcadores metabólicos de estrés oxidativo (Tissot van Patot *et al.*, 2010, 2004; Hochachka *et al.*, 2002). La presencia de elevadas concentraciones de taurina e inositol sugieren que presentan una mayor capacidad antioxidante, desarrollan mejores reservas energéticas y capacidad de actividad mitocondrial, lo que permite una mejor modelación en las respuestas frente a bajas concentraciones de oxígeno. Debido a la complejidad de estos procesos, es posible que la administración de vitaminas en los resultados observados en el grupo expuesto a hipoxia crónica haya causado efectos más bien adversos que tienen su fundamentación en mecanismos aún no bien definidos asociados a lo que algunos autores denominan “reprogramación metabólica de la placenta” frente a hipoxia crónica (Illsley *et al.*, 2010). Este modelo postula que bajo condiciones de hipoxia crónica la placenta se va adecuando en función de una disminución del crecimiento fetal, promoviendo incrementos en el transporte y disponibilidad de oxígeno y disminuyendo la transferencia de glucosa, lo que permite la sobrevivencia del feto en desmedro de su crecimiento y desarrollo. Este proceso involucraría cambios adaptativos celulares que no necesariamente estarían gatillados por el estado hipóxico y de HIF-1 α ya que consideran a otros metabolitos como hormonas, citoquinas y factores de crecimiento, que se encuentran aumentados en la circulación materna durante la gestación (Pringle *et al.*, 2010). De este modo, es posible que existan otros elementos a considerar en el efecto de la administración de terapia antioxidante sobre la expresión de HIF-1 α en hembras adaptadas por varias generaciones a ambientes de altura.

Estudios previos guiados por Parraguez *et al.* (2010) reportaron cambios en la placenta de ovejas con gestaciones en altura asociados a la sobreexpresión de factores angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS). Sin embargo, la administración de antioxidantes en placentas hipóxicas de altura permitió la reducción de la expresión local de estos factores, con consecuencias altamente beneficiosas desde el punto de vista de la masa y vasculatura placentaria, ya que se incrementa el transporte de oxígeno reduciendo el estrés oxidativo (Parraguez *et al.*, 2011). En nuestro estudio encontramos que la expresión de HIF-1 α disminuye significativamente cuando se administra terapia antioxidante a ovejas que gestan bajo condiciones de hipoxia hipobárica (AV) comparado con los grupos no tratados (A). Es así como las ovejas que reciben el tratamiento antioxidante expresan HIF-1 α en un 38% menos en comparación con las que no lo reciben. Esta disminución en la sobreexpresión de HIF-1 α es positiva debido a que estaría reflejando un más eficiente control del estrés oxidativo al administrar vitaminas antioxidantes en gestaciones llevadas a cabo en la altura.

La exposición a hipoxia de altura está asociada a la presentación de estrés oxidativo incrementándose la generación de ROS y el consecuente daño oxidativo celular (Hubel *et al.*, 1989; Fattman *et al.*, 2003). La altura es uno de los factores que debilita los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos del organismo, por lo que una dieta que contemple dosis mayores de vitaminas antioxidantes es beneficiosa para reducir este daño oxidativo inducido por la altura (Ilavazhagan *et al.*, 2001; Magalhaes *et al.*, 2005; Dosek *et al.*, 2007). Es ampliamente aceptado que los rumiantes tienen la capacidad de sintetizar sus propias fuentes de ácido ascórbico para satisfacer sus requerimientos, pero bajo ciertas circunstancias de estrés y aclimatación es necesario incorporar suplementación vitamínica y así reducir los efectos de una

deficiencia (Black y Hidiroglou, 1996). Aún cuando ha existido controversia en relación con la administración oral de vitamina C y sus niveles plasmáticos (Knight *et al.*, 1941), evidencia más reciente demuestra lo contrario (Hidiroglou *et al.*, 1997; Hidiroglou, 1999; Parraguez *et al.*, 2011) indicando que la administración oral de esta vitamina en ovejas durante la gestación, aumenta significativamente sus concentraciones plasmáticas. En gestaciones ovinas se ha demostrado que la administración de una terapia antioxidante tiene un efecto significativo en la prevención del estrés oxidativo, lo que se ve reflejado en cambios positivos asociados a incrementos en los pesos al nacimientos, pero no en un aumento de la superficie placentaria que permitiría una mejor transferencia de nutrientes de la madre al feto (Parraguez *et al.*, 2011). Esta aparente inconsistencia entre crecimiento fetal y administración de vitaminas antioxidantes estaría explicada porque no necesariamente para que crezca un animal necesita un mayor lecho vascular, sino más bien un flujo sanguíneo más eficiente, derivado de una mejor función vascular.

Consideramos interesante lo que sucede con la variable origen en la expresión de HIF-1 α , ya que cuando se asocia a altura de gestación se observa un efecto significativo ($p \leq 0,001$), pero no cuando se asocia a administración de vitamina ($p = 0,667$). Esto podría tener su explicación en el hecho de que existe importante evidencia de los cambios adaptativos que ocurren en las poblaciones humanas y animales expuestas a hipoxia hipobárica de altura por varias generaciones en comparación con aquellas que han sido expuestas sólo por un corto período de tiempo (Moore *et al.*, 2001; Hartinger *et al.*, 2006, Tissot van Patot *et al.*, 2009; Parraguez *et al.*, 2011). Recientemente ha sido demostrado que existen significativas diferencias en la magnitud de los efectos de la altura de origen sobre las características de la preñez y los recién nacidos de hembras ovinas que han habitado las tierras altas por varias generaciones, comparadas con hembras nativas de tierras bajas que son llevadas a gestar a

la altura y hembras nativas del bajo que gestan en su ambiente de origen (Parraguez *et al.*, 2005; Parraguez *et al.*, 2006a). Así mismo, otros autores han estudiado estas y otras características en mujeres embarazadas con residencia permanente en la altura y las han comparado con mujeres embarazadas que sólo han desarrollado su gestación en un ambiente de altura (Yip, 1987; Jensen y Moore, 1997; Mortola *et al.*, 2000; Giussani *et al.*, 2001; Keyes *et al.*, 2003). Los resultados han sido muy semejantes a los observados en hembras ovinas: los hijos de madres residentes en tierras altas resultan con bajos pesos al nacimiento, pero el efecto hipóxico es mayor en los hijos de aquellas madres con corta exposición a la altura. Aún cuando el tiempo de residencia en la altura que llevan las poblaciones humanas (~25.000-50.000 años) es muy superior y no comparable con los rebaños ovinos residentes en el Altiplano andino (~500 años), las diferencias observadas entre los grupos de animales residentes (AA) y los que son llevados a gestar en la altura (BA) serían atribuibles a un incipiente fenómeno de adaptación fisiológica y representaría la diferencia entre larga y corta exposición al ambiente de altura (Moore, 2003, 2001; Moore *et al.*, 2004, 2001; Monge y León-Velarde, 1991).

Basados en lo anteriormente analizado, el comportamiento de la variable origen sugiere que, aun cuando se administre terapia antioxidante, su efecto no es suficiente para generar una diferencia significativa en la expresión inmunoreactiva de HIF-1 α , en contraste con lo que ocurre con la altura de gestación, donde la mayor expresión se produce en aquellas ovejas nativas de las tierras bajas que son llevadas a gestar a la altura sin terapia (BA), es decir, con un corto período de aclimatación a la hipoxia hipobárica de altura. Estos resultados confirman que si bien es cierto, la administración de vitaminas es fundamental en el mejoramiento de los parámetros esperados al nacimiento, la adaptación de los rebaños durante varias generaciones en la altura, es una

fuerte condición ambiental que se traduce en cambios adaptativos fisiológicos significativos para la gestación ovina.

Al considerar el efecto conjunto de todas las variables analizadas se observa que en general el tratamiento con antioxidante permite disminuir significativamente la expresión de HIF-1 α . El único grupo que no muestra diferencias significativas corresponde a aquellas ovejas originarias de nivel del mar que gestan en su ambiente (BB) comparado con el mismo grupo con administración de terapia antioxidante (BBV). Estos resultados son consistentes con lo observado por Parraguez *et al.* (2011) donde a pesar de la administración de vitaminas C y E a ovejas gestantes a nivel del mar, ésta no tuvo un efecto significativo en los cambios estructurales y morfológicos en placentas bajo estado de normoxia. De este modo, es posible sugerir que bajo condiciones ambientales con tensión de oxígeno normal no habría sobreexpresión de HIF-1 α y la suplementación con antioxidantes no marcaría una diferencia en términos de hacer más eficiente la función placentaria. Sin embargo, estudios realizados por Takor *et al.* (2010) concluyen que la administración de antioxidantes como melatonina y vitamina C en ovejas gestantes con baja síntesis de ON, incrementan significativamente el flujo sanguíneo umbilical mediante la vasodilatación estimulada por la síntesis y disponibilidad de ON, por lo que sería clínicamente positivo utilizar este tratamiento en animales con gestaciones patológicas, aún cuando éstas se desarrollen en un ambiente con tensión normal de oxígeno.

Un resultado interesante, fue el observado en el grupo de altura que fue llevado a gestar al bajo (AB) donde la expresión de HIF-1 α fue superior, incluso respecto del grupo nativo (AA) o del grupo de corta exposición a la altura (BA). Aparentemente, la respuesta estaría en el hecho de que animales adaptados a hipoxia y trasladados a un ambiente normóxico se podría considerar como un

estado de hiperoxia o reoxigenación, cuya consecuencia se observa en un incremento de ROS que contribuyen al estrés oxidativo (Miyata *et al.*, 2011). Esta paradoja, en la cual el estrés oxidativo es gatillado no sólo por una disminución, sino también por un incremento en la tensión de oxígeno, la podemos corroborar basados en las investigaciones de Kulkarni *et al.* (2007) en las que demuestran los beneficios clínicos del uso de diferentes agentes terapéuticos en la captación y prevención de la generación de ROS a diferentes niveles de oxígeno. En concordancia con esto, el resultado obtenido en el grupo con tratamiento antioxidante (ABV) donde disminuye significativamente la expresión de HIF-1 α , nos permite sugerir que en individuos nativos y adaptados al ambiente hipóxico de altura que son llevados a gestar en normoxia, la administración de antioxidantes es también beneficiosa ya que permite disminuir el estrés oxidativo.

CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este estudio, podríamos concluir que:

1. La expresión placentaria de HIF-1 α en ovejas gestantes en ambientes de altura de larga y corta exposición, está incrementada debido al ambiente hipóxico.
2. La administración oral de vitaminas antioxidantes disminuye la expresión de HIF-1 α debido a que ayuda a contrarrestar los efectos del daño oxidativo producido por la exposición a hipoxia hipobárica.
3. Las diferencias observadas en la expresión de HIF-1 α entre los distintos grupos de animales analizados nos ayuda a comprender el rol de HIF-1 α en el desarrollo de la placenta y los efectos que de la administración de una terapia antioxidante tiene en la gestación ovina.

BIBLIOGRAFIA

Abelson, A.E. **1976**. Altitude and fertility. *Hum. Biol.* 48:83-92.

Adelman, D.M., Gertsenstein, M., Nagy A., Simon, M.C., Maltepe, E. **2000**. Placental cell fates are regulated in vivo by *HIF*-mediated hypoxia responses. *Genes Dev* 14:3 p.191-203.

Alexander, G. **1974**. Birth weight of lambs: influences and consequences: size at birth: a ciba foundation symposium. *Association of Scientific Publishers*; 215-245.

Ali, K.Z., Ali, M.E., Khalid, M.E. **1996**. High altitude and spontaneous preterm birth. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 54:11-15.

Andersen, D. H. **1926**. Lymphatics and blood vessels of the ovary of the sow. *Contrib. Embryol. Carnegie Inst.* 17:107-123.

Aurousseau, B., Durand, D. and Gruffat, D. **2004**. Control of oxidative phenomenon during gestation in monogastrics and ruminants. *Prod. Anim.* 17:339–354.

Banai S., Shweiki, D., Pinson, A., Chandra, M., Lazarovici, G., Keshet, E. **1994**. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: Implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* 28:1176-1179.

Bailey, D.M. and Davies, B. **2001**. Acute mountain sickness; prophylactic benefits of antioxidant vitamin supplementation at high altitude. *High Altitude Medicine and Biology* 2, 21-29.

Barker, D.J.P. **1998**. Mothers, Babies and Health in Later Life. Church Livingstone; Edinburgh.

Barker, D.J.P. **2001**. Fetal origins of cardiovascular and lung disease. D.J.P. Barker (Ed). Edition 1. Marcel Dekker Inc. NY. 398 p.

Barker, D.J. and Lackland, D.T. **2003**. Prenatal influences on stroke mortality in England and Wales. *Stroke* 34:1598-1602.

Barker, D.J., Hales, C.N., Fall, C.H., Osmond, C., Phipps, K., Clark, P.M. **1993a**. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and Hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36: 62-67.

Barker, D.J., Osmond, C., Simmonds, S.J., Wield, G.A. **1993b**. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *Br. Med. J.* 306: 422-426.

Barry, J.S. and Anthony, R.V. **2008**. The pregnant sheep as a model for human pregnancy. *Theriogenology* 69:55-67.

Bassett, D. L. **1943**. The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *Am. J. Anat.* 73: 251-291.

Battaglia, F.C., Meschia, G., Makowski, E.L., Bowes, W. **1968**. The effect of maternal oxygen inhalation upon fetal oxygenation. *J Clin Invest* 47:548–555. [PubMed: 5688919].

Bell, A.W., Hay, W.W.Jr., Ehrhardt, R.A. **1999**. Placental transport of nutrients and its implications for fetal growth. *J Reprod Fert, Suppl* 54:401-410.

Bernstein, I.M., Horbar, J.D., Badger, G.J., Ohlsson, A., Golan, A. **2000**. Morbidity and mortality among very-lowbirth-weight neonates with intrauterine growth restriction. The Vermont Oxford Network. *Am J Obstet Gynecol* 182:198–206. [PubMed: 10649179]

Berchner-Pfannschmidt, U., Tug, S., Trinidad, B., Oehme, F., Yamac, H., Wotzlaw, C., Flamme, I., Fandrey, J. **2008**. Nuclear oxygen sensing: induction of endogenous prolyl-hydroxylase 2 activity by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem* 283: 31745-31753.

Black, W. D. and Hidioglou, M. **1996**. Pharmacokinetic study of ascorbic acid in sheep. *Can. J. Vet. Res.* 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.

Breier, G., Damert, A., Plate, K.H., Risau, W. **1997**. Angiogenesis in embryos and ischemic diseases. *Thromb Haemostasis* 78:678–683.

Brosens, I., Robertson, W.B., Dixon, H.G. **1967**. The physiological response to the vessels of the placental bed to normal pregnancy. *J Pathol Bacteriol* 93:569–579. [PubMed: 6054057].

Bruce, N.W. and Moor, R.M. **1976**. Capillary blood flow to ovarian follicles, stroma and corpora lutea of anaesthetized sheep. *J. Reprod. Fertil.* 46:299-304.

Bruick, R.K. **2003**. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev* 17:2614-23.

Brunelle, J.K., Bell, E.L., Quesada, N.M., Vercauteren, K., Tiranti, V., Zeviani, M., Scarpulla, R.C., Chandel, N.S. **2005**. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 1:409–414.

Burr, J.H. and Davies, J.I. **1951**. The vascular system of the rabbit ovary and its relationship to ovulation. *Anat. Record* 111: 273-297.

Cale, J.M., Millican, D.S., Itoh, H., Magness, R.R., Bird, I.M. **1997**. Pregnancy induces an increase in the expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in uterine artery endothelial cells. *J Soc Gynecol Invest* 4: 284–292.

Carmeliet, P. **2000**. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6:389-395.

Carmeliet, P. and Jain, R.K. **2000**. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Klenkens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A. **1996**. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380:435-439.

Carter, A.M. **1989**. Factors affecting gas transfer across the placenta and the oxygen supply to the fetus. *J Dev Physiol* 12:305–322. [PubMed: 2701106].

Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M., Schumacker, P.T. **2000**. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize Hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 275: 25130-25138.

Chappell, L.C., Seed, P.T., Briley, A.L. **1999**. Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomised trial. *Lancet* 354: 810-816.

Chappell, L.C., Seed, P.T., Kelly, F.J., Briley, A., Hunt, B.J., Charnock-Jones, D.S., Mallet, A., 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. *Am J Obstet Gynecol* 187: 777-784.

Charnock-Jones, D.S., Kaufmann, P., Mayhew, T.M. **2004**. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 25:103-113.

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., 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.

Christenson, L.K. and Stouffer, R.L. **1996**. Proliferation of microvascular endothelial cells in the primate corpus luteum during the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Endocrinology* 137:367-374.

Clark, J.G. **1900**. The origin, development and degeneration of the blood-vessels of the human ovary. *Johns Hopkins Hosp. Rep.* 9: 593-676.

Cock, M.L., Camm, E.J., Louey, S., Joyce, B.J., Harding, R. **2001**. Postnatal outcomes in term and preterm lambs following fetal growth restriction. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 28: 931-937.

Cowden Dahl, K.D., Robertson, S.E., Weaver, V.M., Simon, M.C. **2005a**. Hypoxia-inducible factor regulates alpha-beta3 integrin cell surface expression. *Mol Biol Cell* 16:1901-12.

Cowden Dahl, K.D., Fryer, B.H., Mack, F.A., Compornolle, V., Maltepe, E., Adelman, D.M., Carmeliet, P., Simon, M.C. **2005b**. The Hypoxia-Inducible Factors HIF1alpha and HIF2alpha regulate trophoblast differentiation. *Mol Biol Cell* 25:10479-91.

Cross, J.C., Hemberger, M., Lu, Y., Nozaki, T., Whiteley, K., Masutani, M., Adamson, S.L. **2002**. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol* 187:207-12.

Covello, K.L. and Simon, M.C. **2004**. HIFs, hypoxia, and vascular development. *Curr Top Dev Biol* 62:37-54.

De Carolis, G. **1987**. Descripción del sistema ganadero y hábitos alimentarios de camélidos domésticos y ovinos en el bofedal de Parinacota. [Agr Eng Dissertation]. Santiago, Chile: Universidad de Chile, 1987. 261p.

Denekamp, J. **1984**. Vasculature as a target for tumour therapy. In: F. Hammersen and O. Hudlicka (Ed.) *Progress in Applied Microcirculation* (Vol. 4). pp 28-38. Karger, Basel, Switzerland.

Deng, C-X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M.M., Daugherty, C., Ornitz, D.M., Leder, P. **1994**. Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev* 8: 3045–3057.

Di Rienzo, J.A., Casnoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M., Robledo, C.W. **2008**. InfoStat. Versión 2008. Grupo InfoStat. FCA. Universidad de Córdoba, Argentina.

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

Droge, W. **2002**. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47–95.

Ehleben, W., Bolling, B., Merten, E., Porwol, T., Strohmaier, A.R., Acker, H., **1998**. Cytochromes and oxygen radicals as putative members of the oxygen sensing pathway. *Respir Physiol* 114: 25-36.

Ellinwood, W.E., Nett, T.M., Niswender, G.D. **1978**. Ovarian vasculature: Structure and function. In: R.E. Jones (Ed.). *The Vertebrate Ovary*. pp 583-614. Plenum Press, New York.

Eppert, K., Wunder, J.S., Aneliunas, V., Kandel, R., Andrulis, I.L. **2005**. von Willebrand factor expression in osteosarcoma metastasis. *Modern Pathology* 18: 388-397.

Escudero, F., Gonzalez, G.F., Gonez, C. **1996**. Hormona profile during the menstrual cycle al high altitude. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 55:49-58.

Fang, S. **2005**. Management of preterm infants with intrauterine growth restriction. *Early Hum Dev* 81:889–900. [PubMed: 16266791]

Fattman, C.L., Schaefer, L.M., Oury, T.D. **2003**. Extracellular superoxide dismutase in biology and medicine. *Free Radic Biol Med* 35: 236-256.

Ferrara, N. **1996**. The biology of vascular endothelial growth factor. In: M. E. Maragoudakis (Ed.) *Molecular, Cellular, and Clinical Aspects of Angiogenesis*. pp 73-83. Plenum Press, New York.

Ferrara, N. **2000**. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. *Rec Prog Horm Res* 55:15–35. [PubMed: 11036931]

Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. **1997**. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 18:4–25.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., Moore, M.W. **1996**. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380:439-442.

Folkman, J. and Klagsbrun, M. **1987**. Angiogenic factors. *Science* 233:442–447.

Fong, G.H. and Takeda, K. **2008**. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. *Cell Death Diff* 15: 635-641.

Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., Semenza, G.L. **1996**. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16:4604-4613.

Fridovich, I. **1978**. Oxygen radicals, hydrogen peroxide and oxygen toxicity. In: Free radicals in Biology. Vol. 1, Pryor WA, ed. Academic Press, New York, pp. 239–277.

Fryer, B.H. and Simon, M.C. **2006** Hypoxia, HIF and the placenta. *Cell Cycle* 5 495–498.

Gale, N.W. and Yancopoulos, G.D. **1999**. Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, Angiopoietins, and ephrins in vascular development. *Genes Dev* 13:1055-1066.

Gale C.R., Ashurst H.E., Hall N.F., MacCallum P.K., Martyn C.N. **2002**. Size at birth and carotid atherosclerosis in later life. *Atherosclerosis* 163: 141-147.

Galan, H.L., Hussey, M.J., Barbera, A., Ferrazzi, E., Chung, M., Hobbins, J.D., and Battaglia, F.C. **1999**. Relationship of fetal growth to duration of heat stress in an ovine model of placental insufficiency. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180, 1278–1282.

Geetha, A., Catherine, J., Shyamala Devi, C.S. **1989**. Effect of alphas-tocopherol on the microsomal lipid peroxidation induced by doxorubicin: influence of ascorbic acid. *Indian J Physiol Pharmacol* 33:53–58.

Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J., Fischer, S. **1997**. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277:1669-1672.

Geva, E., Ginzinger, D.G., Zaloudek, C.J., Moore, D.H., Byrne, A., Jaffe, R.B. **2002**. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J Clin Endo Metab* 87:4213–4224.

Giussani, D.A., Phillips, P.S., Anstee, S., and Barker, J.P. **2001**. Effects of altitude versus economic status on birth weight and body shape at birth. *Pediatr. Res.* 49, 490–494.

Goldman-Wohl, D.S., Ariel, I., Greenfield, C., Lavy, Y., Yagel, S. **2000**. Tie-2 and angiopoietin-2 expression at the fetal-maternal interface: a receptor ligand model for vascular remodeling. *Mol Hum Reprod* 6:81–87. [PubMed: 10611265].

Gospodarowicz, D. **1991**. Biological activities of fibroblast growth factors. *Ann NY Acad Sci* 638:1–8.

Gotoh, N. and Niki, E. **1992**. Rates of interactions of superoxide with vitamin E, vitamin C and related compounds as measured by chemiluminescence. *Biochim Biophys Acta* 1115:201–207.

Grazul-Bilska, A.T., Redmer, D.A., Jablonka-Shariff, A., Biondini, M.E., Reynolds, L.P. **1995**. Proliferation and progesterone production of ovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: effects of fibroblast growth factors (FGF) and luteinizing hormone (LH). *Can J Physiol Pharmacol* 73:491–500.

Grazul-Bilska, A.T., Borowicz, P.P., Johnson, M.L., Minten, M.A., Bilsky, R.W., Wroblewski, D., Redmer, D.A., Reynolds, L.P. **2010**. Placental development during early pregnancy in sheep: vascular growth and expression of angiogenic factors in maternal placenta. *Reproduction* 140 165-174.

Grosser, O. **1909**. Vergleichende anatomie und entwicklungsgeschichte der eihaute und der placenta. Braumuller W; Vienna und Leipzig.

Guzy, R.D and Schumacker, P.T. **2006**. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp. Physiol.* 91:807-819.

Hanahan, D. **1997**. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277:48–50.

Hartinger, S., Tapia, V., Carrillo, C., Bejarano, L., and Gonzales, G.F. **2006**. Birth weight at high altitudes in Perú. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* 93, 275–281.

Hidiroglou, M. **1999**. Technical note: Forms and route of vitamin C supplementation for cows. *Journal of Dairy Sciences* 82: 1831-1833.

Hidiroglou, 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.

Hochachka, P.W., Beatty, C.L., Burelle, Y., Trump, M.E., McKenzie, D.C., Matheson, G.O. **2002**. The lactate paradox in human high-altitude physiological performance. *News Physiol Sci* 17: 122–126.

Hubel, C.A., Griggs, K.C. and M^o Laughlin, M.K. **1989**. Lipid peroxidation and altered vascular function in vitamin E-deficient rats. *Am. J. Physiol.* 256. H1539-H1545.

Hudlicka, O. **1984**. Development of microcirculation: Capillary growth and adaptation. In: E. M. Renkin and C. C. Michel (Ed.) *Handbook of Physiology*. pp 165-216. Waverly Press, Baltimore, MD.

Ignarro, L.J., Fukuto, J.M., Griscavage, J.M. **1993**. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8103–8107.

Ilavazhagan, G., Bansal, A., Prasad, D., Thomas, P., Sharma, S.K., Kain, A.K., Kumar, D., and Selvamurthy, W. **2001**. Effect of vitamin E supplementation on hypoxia-induced oxidative damage in male albino rats. *Aviat. Space Environ. Med.* 72, 899–903.

Illsley, N.P., Caniggia, I. and Zamudio, S. **2010**. Placental metabolic reprogramming: do changes in the mix of energy-generating substrates modulate fetal growth? *Int. J. Dev. Biol.* 54: 409-419.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., Kaelin Jr., W.G. **2001**. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: Implications for O₂ sensing. *Science* 292:464-8.

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J. and others. **2001**. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468-72.

Jablonka-Shariff, A., Grazul-Bilska, A.T., Redmer, D.A., Reynolds, L.P. **1993**. Growth and cellular proliferation of ovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Endocrinology* 133:1871-1879.

Jablonka-Shariff, A., Fricke, P.M., Grazul-Bilska, A.T., Reynolds, L.P., Redmer, D.A. **1994**. Size, number, cellular proliferation, and atresia of gonadotropin-induced follicles in ewes. *Biol. Reprod.* 51:531-540.

Jackson, T.S., Xu, A., Vita, J.A. **1998**. Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations. *Circ Res* 83:916–922.

Jainudeen, M.R. y Hafez, E.S.E. **2002**. Incapacidad reproductiva en hembras. Cap.17. En: E.S.E. Hafez y B. Hafez (Eds.) *Reproducción e inseminación artificial en animales*. 7^a edición. M^cGraw-Hill Interamericana. México DF, México. pp 269-286.

Jefferson, J.A., Simoni, J., Escudero, E., Hurtado, M.E., Swenson, E.R., Wesson, D.E., Schreiner, G.F., Schoene, R.B., Johnson, R.J., Hurtado, A. **2004**. Increased oxidative stress following acute and chronic high altitude exposure. *High Alt. Med. Biol.* 5: 61–69.

Jensen, G.M. and Moore, L.G. **1997**. The effect of high altitude and other risk factors on birthweight: independent or interactive effects? *Am. J. Public Health* 87, 1003–1007.

Jones, R.D., Hancock, J.T., Morice, A.H. **2000**. NADPH oxidase: a universal oxygen sensor? *Free Radic. Biol. Med.* 29: 416-424.

Kaelin, W.G. Jr and Ratcliffe, P.J. **2008**. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell* 30: 393-402.

Katavetin, P., Miyata, T., Inagi, R., Tanaka, T., Sassa, R., Ingelfinger, J.R., Fujita, T., Nangaku, M. **2006**. High glucose blunts vascular endothelial growth factor response to hypoxia via the oxidativestress-regulated hypoxia-inducible factor/hypoxia-responsible element pathway. *J Am Soc Nephrol* 17: 1405-1413.

Kaufmann, P., Mayhew, T.M., Charnock-Jones, D.S. **2004**. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 25:114-126.

Keyes, P.L. and Wiltbank, M.C. **1988**. Endocrine regulation of the corpus luteum. *Annu. Rev. Physiol.* 50:465-482.

Keyes, L., Armaza, F., Niermeyer, S., Vargas, E., Young, D., Moore, L. **2003**. Intrauterine growth restriction, preeclampsia and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. *Pediatr. Res.* 54: 20-25.

Khalil, R.A. and Granger, J.P. **2002**. Vascular mechanisms of increased arterial pressure in preeclampsia: lessons from animal models. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283: R29-R45.

Klagsbrun, M. and D'Amore, P.A. Regulators of angiogenesis. **1991**. *Annu Rev Physiol* 53: 217.

Klein, P.S. and Melton, D.A. **1994**. Hormonal regulation of embryogenesis: the formation of mesoderm on *Xenopus laevis*. *Endocr Rev* 15:326–341.

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.

Konje, J.C., Howarth, E.S., Kaufmann, P., Taylor, D.J. **2003**. Longitudinal quantification of uterine artery blood volume flow changes during gestation in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Br. J. Obstet. Gynecol.* 110:301-305.

Kramer, M.S., Olivier, M., McLean, F.H., Willis, D.M., Usher, R.H. **1990**. Impact of intrauterine growth retardation and body proportionality on fetal and neonatal outcome. *Pediatrics* 86: 707-713.

Krampl, E. **2002**. Pregnancy at high altitude. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 19, 535-539.

Krebs, C., Longo, D.L., Leiser, R. **1997**. Term ovine placental vasculature: comparison of sea level and high altitude conditions by corrosion cast and histomorphometry. *Placenta* 18: 43–51.

Kobayashi, M. and Yamamoto, M. **2005**. Molecular mechanisms activating the Nrf2 Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antiox Redox Signal* 7: 385-394.

Landvik, S.V., Diplock, A.T., Packer, L. **2002**. Efficacy of vitamin E in human health and disease, in *Handbook of Antioxidants*, 2nd ed., Cadenas, E. and Packer, L., Eds., Marcel Dekker, New York. p.75.

Law, C.M., Egger, P., Dada, O., Delgado, H., Kylberg, E., Lavin, P., Tang, G.H., von Hertzen, H., Shiell, A.W., Barker, D.J. **2000**. Body size at birth and blood pressure among children in developing countries. *Int. J. Epidemiol.* 29: 52-59.

Lee J., Bae S., Jeong J., Kim S. and Kim K. **2004**. Hypoxia-inducible factor (HIF-1): its protein stability and biological functions. *Experimental and Molecular Medicine* 36: 1-12.

Maddock, K.R., Redmer, D.A., Kirsch, J.D., Reynolds, L.P. **1999**. Expression of basic fibroblast growth factor in placental tissues of early pregnant ewes. *J Anim Sci* 77 (suppl 1):72.

Magalhães, J., Ascensão, A., Marques, F., Viscor, G., Soares, J.M.C., Ferreira, R., Neuparth, M.J., Duarte, J.A. **2005**. Effect of a high-altitude expedition to a Himalayan peak (Pumori, 7,161m) on plasma and erythrocyte antioxidant profile. *Eur J Appl Physiol* 93: 726-732.

Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Weigand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., Daly, T.J., Davis, S., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D. **1997**. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie-2 that disrupts *in vivo* angiogenesis. *Science* 277:50–60.

Maltepe, E., Schmidt, J.V., Baunoch, D., Bradfield, C.A., Simon, M.C. **1997**. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature* 386:403-7.

Maltepe, E., Krampitz, G.W., Okazaki, K.M., Red-Horse, K., Mak, W., Simon, M.C., Fisher, S.J. **2005**. Hypoxia-inducible factor-dependent histone deacetylase activity determines stem cell fate in the placenta. *Development* 132:3393-403.

Magness, R.R. **1998**. Maternal cardiovascular and other physiological responses to the endocrinology of pregnancy. In: *The Endocrinology of Pregnancy*, ed. Bazer F.W., pp.507-539. Humana Press, Totowa, NJ.

Makino, Y., Kanopka, A., Wilson, W.J., Tanaka, H., Poellinger, L. **2002**. Inhibitory PAS domain protein (IPAS) is a hypoxia-inducible splicing variant of the hypoxia-inducible factor-3-alpha locus. *J. Biol Chem* 277: 32405-32408.

Marx, J. **2004**. How cells endure low oxygen. *Science* 303:1454-1456.

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.

Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R., Ratcliffe, P.J. **1999**. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature* 399:271-5.

McGrath, K.E., Koniski, A.D., Malik, J., Palis, J. **2003**. Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood* 101:1669-76.

Meschia, G. **1983**. Circulation to female reproduction organs. In: *Handbook of Physiology*, vol.3: 241-267.

Meschia, G., Cotter, J.R., Breathnach, C.S., Barron, D.H. **1965**. The diffusibility of oxygen across the sheep placenta. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* 50:466–480. [PubMed: 5177009].

Metzen, E., Berchner-Pfannschmidt, U., Stengel, P., Marxen, J.H., Stolze, I., Klinger, M., Huang, W.Q., Wotzlaw, C., Hellwig-Burgel, T., Jelkmann, W., Acker, H., Fandrey, J. **2003**. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J Cell Sci* 116:1319-1326.

Min, J.H., Yang, H., Ivan, M., Gertler, F., Kaelin Jr., W.G., Pavletich, N.P. **2002**. Structure of an HIF-1alpha -pVHL complex: Hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296:1886-9.

Miyata, T., Takizawa, S. and van Ypersele, C. **2011**. Hypoxia. 1. Intracellular sensors for oxygen and oxidative stress: novel therapeutic targets. *Am J Physiol Cell Physiol* 300; C226-C231.

Monge, C. and León-Velarde, F. **1991**. Physiological adaptation to high altitude: oxygen transport in mammals and birds. *Physiol. Rev.* 71, 1135-1172.

Moore, L.G. **2001**. Human genetic adaptation to high altitude. *High Alt. Med. Biol.* 2:257–279.

Moore, L.G. **2003**. Fetal growth restriction and maternal oxygen transport during high altitude pregnancy. *High Alt. Med. Biol.* 4, 141-156.

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. *Am. J. Hum. Biol.* 13, 635–644.

Moore, L.G., Shriver, M., Bemis, L., Hickler, B., Wilson, M., Brutsaert, T., Parra, E., Vargas, E. **2004**. Maternal adaptation to high-altitude pregnancy: an experiment of nature—a review. *Placenta* (Suppl. A, Trophoblast Research) 18: S60–S71.

Mortola, J.P., Frappell, P.B., Agüero, L., and Armstrong, K. **2000**. Birth weight and altitude: a study in Peruvian communities. *J. Pediatr.* 136, 324–329.

Murphy, V., Smith, R., Giles, W., Clifton, V. **2006**. Endocrine regulation of human fetal growth: The role of the mother, placenta and fetus. *Endocrine Rev.* 27:141-169.

Myatt, L. and Cui, X. **2004**. Oxidative stress in placenta. *Histochem. Cell Biol.* 122: 369-382.

National Center for Health Statistics. Final Natality Data. Retrieved July 10, 2007 from www.marchofdimes.com/peristats.

Neidlinger, N.A., Hirvela, E.R., Skinner, R.A., Larkin, S.K., Harken, A.H., Kuypers, F.A. **2005**. Postinjury serum secretory phospholipase A2 correlates with hypoxemia and clinical status at 72 hours. *J. Am. Coll. Surg.* 200: 173-178.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., Poltorak, Z. **1999**. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 13:9–22.

Nguyen, T., Sherratt, P.J., Pickett, C.B. **2003**. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43: 233-260.

Nicosia, S.V., Díaz, J., Nicosia, R.F., Saunders, B.O., Muro-Cacho, C. **1995**. Cell proliferation and apoptosis during development and aging of the rabbit corpus luteum. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 25:143-157.

NRC. **1985**. Nutrient Requirements of Sheep. Committee on Animal Nutrition, National Research Council. 6th Edition. Washington, DC. National Academy Press. pp.45.

Okumura, A., Fuse, H., Kawauchi, Y., Akashi, T. **2003**. Changes in male reproductive function after high altitude mountaineering. *High Alt. Med. Biol.* 4:349-353.

Palmer, S.K., Moore, L.G., Young, D., Cregger, B., Berman, J.C., Zamudio, S. **1999**. Altered blood pressure course during normal pregnancy and increased preeclampsia at high altitude (3.100 meters) in Colorado. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180: 1161-1168.

Pan, Y., Mansfield, K.D., Bertozzi, C.C., Rudenko, V., Chan, D.A., Giaccia, A.J., Simon, M.C. **2007**. Multiple factors affecting cellular redox status and energy metabolism modulate hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase activity in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 7: 912-925.

Pardi, G. and Cetin, I. **2006**. Human fetal growth and organ development: 50 years of discoveries. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194: 1088–1099. [PubMed: 16580300].

Park, H.S., Kim, S.R. and Lee, Y.C. **2009**. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology* **14**, 27–38.

Parraguez, V.H., Atlagich, M., Díaz, R., Bruzzone, M.E., Behn, C., Raggi, L.A. **2004**. Lambs growth at high altitude: comparison between animals with different time of adaptation to hypoxic environment. *Agro-Ciencia* 20:39-45.

Parraguez, V.H., Atlagich, M., Díaz, R., Bruzzone, M.E., Behn, C., Raggi, L.A. **2005**. Effect of hypobaric hypoxia on lamb intrauterine growth: comparison between high- and low-altitude native ewes. *Reprod. Fertil. Dev.* 17: 497–505.

Parraguez, V.H., Atlagich, M., Behn, C., Bruzzone, M.E., Raggi, L.A., **2006a**. Fertility in ewes at high altitude: comparison between animals with long- and short-time residence at high altitude and the effect of antioxidant vitamins. *10th*

Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction. (ESDAR), Portoroz, Eslovenia.

Parraguez, V.H., Atlagich, M., Díaz, R., Bruzzone, M.E., Behn, C., Raggi, L.A., **2006b**. Effect of antioxidants in ovine placenta and newborn weight in pregnancies under natural hypoxia: comparison between long- and short-time residences at high altitude. *Placenta* 27: A.38.

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

Parraguez, V.H., Atlagich, M., 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. *Repr Fert Dev* 23: 285-296.

Penninga, L. and Longo, L.D. **1998**. Ovine placentome morphology: effect of high altitude, long-term hypoxia. *Placenta* 19, 187–193.

Pialoux, V., Mounier, R., Ponsot, E., Rock, E., Mazur, A., Dufour, S., Richard, R., Richalet, J.P., Coudert, J., Fellmann, N. **2006**. Effects on exercise and training in hypoxia on antioxidant/pro-oxidant balance. *Eur J Clin Nutr* 60: 1345-1354.

Pialoux, V., Mounier, R., Brown, A., Steinback, C., Rawling, J., Poulin, M. **2009**. Relationship between oxidative stress and HIF-1 α mRNA during sustained hypoxia in humans. *F Rad Biol and Med* 46: 321-326.

Pringle, K.G., Kind K.L., Sferruzzi-Perri A.N., Thompson J.G. and Roberts, C.T. **2010**. Beyond oxygen: complex regulation and activity of hypoxia inducible factors in pregnancy. *Human Reproduction Update*, Vol.16, No.4 pp. 415–431.

Ramsey, E.M. **1982**. The placenta human and animal. Praeger.

Redmer, D.A. and Reynolds, L.P. **1996**. Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod.* 1:182-192.

Reshetnikova, O.S., Burton, G.J., Milovanov, A.P., Fokin, E.I. **1996**. Increased incidence of placental choriangioma in high-altitude pregnancies: hypobaric hypoxia as possible etiologic factor. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 174:557-561.

Resnik, R. **2002**. Intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol* 99:490–496. [PubMed: 11864679].

Reynolds, L.P. **1986**. Utero-ovarian interactions during early pregnancy: Role of conceptus-induced vasodilation. *J. Anim. Sci.* 62 (Suppl. 2):47-61.

Reynolds, L.P. and Redmer, D.A. **1992**. Growth and microvascular development of the uterus during early pregnancy in ewes. *Biol Reprod* 47:698–708.

Reynolds, L.P. and Redmer, D.A. **1995**. Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci* 73:1839–1851.

Reynolds, L.P. and Redmer, D.A. **2001**. Angiogenesis in the placenta. Mini-review. *Biol Reprod* 64: 1033–40.

Reynolds, L.P., Killilea, S.D., Redmer, D.A. **1992**. Angiogenesis in the female reproductive system. *FASEB J* 6:886–892.

Reynolds, L.P., Killilea, S.D., Grazul-Bilska, A.T., Redmer, D.A. **1994**. Mitogenic factors of corpora lutea. *Prog. Growth Factor Res.* 5:159-175.

Reynolds, L.P., Beckman, J.D., Kirsch, J.D., Kraft, K.C., Redmer, D.A.. **1999**. Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) in ovine uterine and placental tissues of late pregnancy. *Biol Reprod* 60 (suppl 1):217.

Reynolds, L.P., Grazul-Bilska, A.T., Redmer, D.A. **2000**. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 12:1–9.

Reynolds, L.P., Borowicz, P.P., Vonnahme, K.A., Johnson, M.L., Grazul-Bilska, A.T., Redmer, D.A., Caton, J.S. **2005a**. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *The Journal of Physiology* 565, 43-58.

Reynolds, L.P., Borowicz, P.P., Vonnahme, K.A., Johnson, M.L., Grazul-Bilska, A.T., Wallace, J.M., Caton, J.S., Redmer, D.A. **2005b**. Animal models of placental angiogenesis. *Placenta* 26: 689-708.

Rider, V. and Piva, M. **1998**. Role of growth factors of uterine and fetal-placental origin during pregnancy. In: Bazer F.W. (ed.) *The Endocrinology of Pregnancy*. Totowa, NJ: Humana Press; 83–124.

Rinkenberger, J. and Werb, Z. **2000**. The labyrinthine placenta. *Nat Genet* 25:248-50.

Risau, W. **1997**. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671–674.

Risau, W. and Flamme, I. **1995**. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73–91.

Rodrigo, R., Parra, M., Bosco, C. **2005**. Pathophysiological basis for the prophylaxis of preeclampsia through early supplementation with antioxidant vitamins. *Pharmacol Ther*; 107:177-97.

Rosenberguer, C., Khamaisi, M., Abassi, Z., Shilo, V., Weksler-Zangen, S., Goldfarb, M., Shina, A., Zibertrest, F., Eckardt, K.U., Rosen, S., Heyman, S.N. **2008**. Adaptation to hypoxia in the diabetic rat kidney. *Kidney Int* 73: 34-42.

Rumiris, D., Purwosunu, Y., Wibowo, N., Farina, A., Sekizawa, A. **2006**. Lower rate of preeclampsia after antioxidant supplementation in pregnant women with low antioxidant status. *Hypertension in Pregnancy*. 25(3):241–253.

Salnikow, K., Donald, S.P., Bruick, R.K., Zhitkovich, A., Phang, J.M., Kasprzak, K.S. **2004**. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem* 279: 4033-4044.

Schmidt, M.C., Askew, E.W., Roberts, D.E., Prior, R., Ensign, W.Y., Hesslink, R.E. **2002**. Oxidative stress in individuals training in a cold moderate altitude environment and their response to a phytochemical antioxidant supplement. *Wild. Environ. Med.*, 13, pp. 94–105.

Schofield, C.J. and Ratcliffe, P.J. **2004**. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:343-54.

Schroedl, C.J., McClintock, D.S., Budinger, G.R., Chandel, N.S. **2002**. Hypoxic but not anoxic stabilization of HIF-1alpha requires mitochondrial reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L922-L931.

Sen, C.K. **2001**. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling: introduction. *Med. Sci. Sports Exerc.* **33** pp. 368–370

Semenza G.L. **1999**. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* , 15:551-78.

Semenza, G.L. **2000**. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 88: 1474–1480.

Semenza, G.L. **2006**. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol* 91:803-806.

Seval, Y., Korgun, E.T., Demir, R. **2007**. Hofbauer cells in early human placenta: possible implications in vasculogenesis and angiogenesis. *Placenta* 28: 841-845.

Shima, D.T., Adamis, A.P., Ferrara, N., Yeo, K.T., Yeo, T.K., Allende, R., Folkman J., D'Amore. J. **1995**. Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol. Med.* 1:182-193.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., Keshet, E. **1992**. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature (Lond.)* 359:843-845.

Sinha, S., Singh, S.N. and Ray, U.S. **2009**. Total antioxidant status at high altitude in lowlanders and native highlanders: role of uric acid. *High Alt. Med. Biol.* 10: 269-274.

Slack, J.M.W., Darlington, B.G., Heath, J.K., Godsave, S.F. **1987**. Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. *Nature* , 326:197–200.

Sohn, H.Y., Krotz, F., Gloe, T., Keller, M., Theisen, K., Klaus, V., Pohl, U. **2003**. Differential regulation of xanthine and NAD(P)H oxidase by hypoxia in human umbilical vein endothelial cells. Role of nitric oxide and adenosine. *Cardiovasc. Res.* 58: 638-646.

Soma, H., Hata, T., Oguro, T., Fujita, K., Kudo, M., Vaidya, U. **2005**. Characteristics of histopathological and ultrastructural features of placental villa in pregnant Nepalese women. *Med. Mol. Morfol.* 38:92-103.

Steven, D. **1975**. Anatomy of the placental barrier. In: Steven, D.H., editor. *Comparative placentation: assays in structure and function*. Academic Press; London . p. 25-27.

Subudhi, A.W., Jacobs, K.A., Hagobian, T.A., Fattor, J.A., Muza, S.R., Fulco, C.S., Cymerman, A., Friedlander, A.L. **2006**. Changes in ventilatory threshold at high altitude: effect of antioxidants. *Med Sci Sports Ex.* 38(8): 1425-1431.

Suri, C., McClain, J., Thurston, G., McDonald, D.M., Zhou, H., Oldmixon, E.H., Sato, T.N., Yancopoulos, G.D. **1998**. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science* 282:468-471.

Swann, R.T. and Bruce, N.W. **1987**. Oxygen consumption, carbon dioxide production and progesterone secretion in the intact ovary of the day-16 pregnant rat. *J. Reprod. Fertil.* 80:599 -605.

Thakor, A.S., Herrera, E.A., Serón-Ferré, M. and Giussani, D.A. **2010**. Melatonin and vitamin C increase umbilical blood flow via nitric oxide-dependent mechanisms. *J. Pineal Res.*; 49:399–406.

Tilly, J.L., Billig, H., Kowalski, K.I., Hsueh, A.J.W. **1992**. Epidermal growth factor and basic fibroblast growth factor suppress the spontaneous onset of apoptosis in cultured rat ovarian granulosa cells and follicles by a tyrosine kinase-dependent mechanism. *Mol Endocrinol* 6:1942–1950.

Tissot van Patot, M.C., Bendrick-Pearl, J., Beckey, V.E., Serkova, N., and Zwerdinger, L. **2004**. Greater vascularity, lowered HIF-1/DNA binding, and elevated GSH as markers of adaptation to *in vivo* chronic hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287, L525–L532.

Tissot van Patot, M.C., Valdez, M., Becky, V., Cindrova-Davies, T., Johns, J., Zwerdinger, L., Jauniaux, E., and Burton, G.J. **2009**. Impact of pregnancy at high altitude on placental morphology in nonnative women with and without preeclampsia. *Placenta* 30, 523–528.

Tissot van Patot, M.C., Murray A.J., Beckey, V., Cindrova-Davies, T., Johns, J., Zwerdinger, L., Jauniaux, E., Burton, G.J. and Serkova, N.J. **2010**. Human placental metabolic adaptation to chronic hypoxia, high altitude: hypoxic preconditioning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R166–R172.

Torry, D., Hinrichs, M., Torry, R. **2004**. Determinants of placental vascularity. *Am. J. Rep. Immunol.* 51:257-267.

Tuder, R.M., Yun, J.H., Bhunia, A., and Fijalkowska, I. **2007**. Hypoxia and chronic lung disease. *J. Mol. Med.* 85, 1317–1324.

Tug, S., De los Reyes, B., Fandrey, J., Berchner-Pfannschmidt, U. **2009**. Non-hypoxic activation of the negative regulatory feedback loop of prolylhydroxylase oxygen sensors. *Biochem Biophys Res Commun* 384: 519-523.

United Nations Children's Fund (UNICEF). The State of the World's Children. **2007**. Available online at: www.unicef.org/publications

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 Histochem.* 108, 59–68.

Vanderlelie, J., Venardos, K., Clifton, V.L., Gude, N.M., Clarke, F.M., Perkinns, A.V. **2005**. Increased biological oxidation and reduced anti-oxidant enzyme activity in preeclamptic placentae. *Placenta* 26: 53-56.

Vatnick, I., Schoknecht, R., Darrigrand, R. and Bell, A.W. **1991**. Growth and metabolism of the placenta after unilateral fetectomy in twin pregnant ewes. *J Dev Physiol*; 15:351–356.

Vonnahme, K.A., Hess, B.W., Hansen, T.R., McCormick, R.J., Rule, D.C., Moss, G.E., Murdoch, W.J., Nijland, M.J., Skinner, D.C., and Nathanielsz, P.W. **2003**. Maternal undernutrition from early- to midgestation leads to growth retardation, cardiac ventricular hypertrophy, and increased liver weight in the fetal sheep. *Biol. Reprod.* 69, 133–140.

Wallace, J.M., Bourke, D.A., Aitken, R.P. **1999**. Nutrition and fetal growth: paradoxical effects in the overnourished adolescent sheep. *J Reprod Fert, Suppl* 54:385-399.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. **1995**. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5510–5514.

Wang, W., Fang, H., Groom, L., Cheng, A., Zhang, W., Liu, J., Wang, X., Li, K., Han, P., Zheng, M., Yin, J., Wang, W., Mattson, M.P., Kao, J.P., Lakatta, E.G., Sheu, S.S., Ouyang, K., Chen, J., Dirksen, R.T., Cheng, H. **2008**. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 134: 279-290.

Wheeler, T., Evans, P., Anthony, F., Godfrey, K., Howe, D., Osmond, C. **1999**. Relationship between maternal serum vascular endothelial growth factor concentration in early pregnancy and fetal and placental growth. *Hum Rep.* 14:1619-1623.

Wilcox, A.J., Weinberg, C.R., O'Conner, J.F., Baird, D.D., Schlatterer, J.P., Canfield, R.E., Armstrong, E.G., Nisula, B.C. **1988**. Incidence of early loss of pregnancy. *N Engl J Med* 319:189–194. [PubMed: 3393170].

Yamaguchi, T.P., Harpal, K., Henkemeyer, M. and Rossant, J. **1994**. FGFR-1 is required for embryonic growth and mesodermal patterning during mouse gastrulation. *Genes Dev*, 15:3032–3044.

Yasuda, T., Grinspan, J., Stern, J., Franceschini, B., Bannerman, P., Pleasure, D. **1995**. Apoptosis occurs in the oligodendroglial lineage, and is prevented by basic fibroblast growth factor. *J Neurosci Res* 40:306–317.

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.

Yip, R. **1987**. Altitude and birth weight. *J. Pediatr.* 111, 869–876.

Yoh, K., Hirayama, A., Ishisaki, K., Yamada, A., Takeuchi, M., Yamagishi, S., Morito, N., Nakano, T., Ojima, M., Shimohata, H., Itoh, K., Takahashi, S., Yamamoto, M. **2008**. Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. *Genes Cells* 13: 1159-1170.

Yu, F., White, S.B., Zhao, Q., Lee, F.S. **2001**. HIF-1alpha binding to VHL is regulated by stimulus-sensitive proline hydroxylation. *Proc Natl Acad Sci, USA* 98: 9630-5.

Zamudio, S. **2003**. The placenta at high altitude. *High Alt. Med. Biol.* 4:171-191.

Zhao, J.P., Zhou, Z.G., Hu, H., Guo, Z., Wang, T., Zhen G.H., Zhang, Z.X. **2007**. The relationships among reactive oxygen species, hypoxia-inducible factor 1alpha and cell proliferation in rat pulmonary arterial smooth muscle cells under hypoxia. *Sheng Li Xue Bao* 59: 319-324.

Zheng, J., Redmer, D.A., Reynolds, L.P. **1993**. Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 49:1177-1189.

Zheng J., Fricke, P.M., Reynolds, L.P., Redmer, D.A. **1994**. Evaluation of growth, cell proliferation, and cell death in bovine corpora lutea throughout the estrous cycle. *Biol. Reprod.* 51: 623-632.

Zheng, J., Magness, R.R., Redmer, D.A., Reynolds, L.P. **1995**. Angiogenic activity of ovine placental tissues: Immunoneutralization with FGF-2 and VEGF antisera. *J Soc Gynecol Invest* 2:289.

Zheng, J., Redmer, D.A., Killilea, S.D., Reynolds, L.P. **1998**. Characterization of heparin-binding endothelial mitogens produced by the ovine endometrium during early pregnancy. *Biochem Cell Biol* , 76:89–96.

Zheng, J., Bird, I.M., Melsaether, A.N., Magness, R.R. **1999**. Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade is necessary but not sufficient for basic fibroblast growth factor- and epidermal growth factor stimulated expression of endothelial nitric oxide synthase in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Endocrinology* 140:1399–1407.

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., Münstdt, K., Lang, U., Liang, O.D. **2003**. Angiogenesis and vasculogenesis in pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 110:510-518.