



UNIVERSIDAD DE CHILE



**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS**

**CONCENTRACIONES PLASMÁTICAS DE ESTRADIOL Y
PROGESTERONA EN OVEJAS GESTANTES
ADAPTADAS Y NO ADAPTADAS A LA ALTURA,
SUPLEMENTADAS CON ANTIOXIDANTES.**

PAZ ALEJANDRA MOCARQUER SEMLER

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

PROFESOR GUIA: DR. VICTOR HUGO PARRAGUEZ GAMBOA

FINANCIAMIENTO: PROYECTO FONDECYT 1020706

SANTIAGO, CHILE

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
OBJETIVOS.....	12
MATERIAL Y MÉTODO.....	13
RESULTADOS.....	18
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de la suplementación con antioxidantes (vitamina C y E) sobre la concentración plasmática de progesterona y 17β -estradiol, durante la gestación en ambiente hipobárico e hipóxico en ovejas criollas adaptadas (HH+V) y no adaptadas a la altura (LH+V).

Para ello se utilizaron 12 ovejas preñadas, de las cuales 6 de ellas eran originarias de la localidad de Putre (3.600 m.s.n.m), las otras 6 ovejas provenían del nivel del mar y fueron llevadas a la altura para su encaste y gestación.

A los 60 días de gestación a los 12 animales se les instalaron catéteres permanentes de silástico, bajo anestesia general, en la arteria y vena femoral del miembro posterior izquierdo. Luego de 6 días de recuperación quirúrgica, se comenzó a extraer cada 3 días hasta el parto muestras sanguíneas desde el catéter venoso para realizar las mediciones de las hormonas esteroidales mediante la técnica de radioinmunoanálisis. Adicionalmente, con el objetivo de conocer el grado de aclimatación de los animales al ambiente hipobárico e hipóxico se extrajeron muestras sanguíneas desde el catéter arterial y venoso para la medición de presión parcial de oxígeno (PO_2), presión parcial de anhídrido carbónico (PCO_2), volumen globular aglomerado (V.G.A.), concentración de hemoglobina (THb), saturación de Hemoglobina por oxígeno (O_2Hb) y pH.

Se estableció que la administración de antioxidantes aumenta significativamente las concentraciones plasmáticas de progesterona y 17β -estradiol, así como también el peso de los recién nacidos. Los resultados indican que los efectos de la hipoxia hipobárica son revertidos con la administración de vitaminas C y E, lo que confirma un estado de estrés oxidativo en la preñez a gran altura.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the effect of the supplementation of vitamins C and E on concentrations of progesterone and 17β -oestradiol in pregnant ewes under hypobaric hypoxic conditions, comparing ewes from high (HH+V) and low altitudes (LH+V).

Twelve pregnant ewes were used for the experiment. Six of them were from Putre (at 3,600 meter above sea level) and the other six at sea level and were moved to high altitude for mating in order to get pregnancies.

At 60 days of pregnancy all females were catheterized with silastic connectors under general anesthesia, through the left femoral vein and artery. After 6 days of surgery, blood samples were taken from the vein catheter every 3 days until birth in order to determine the hormones concentration by radioimmunoassay technique. Furthermore, to know the effect of hypobaric hypoxia on other blood variables, samples were taken from the vein and artery to measure partial pressure of oxygen (PO_2), partial pressure of carbon dioxide (PCO_2), hematocrit (V.G.A.), hemoglobin concentration (THb), hemoglobin oxygen saturation (O_2Hb) and pH.

It was established that antioxidants supplementation raises significantly plasma concentration of progesterone, 17β -oestradiol and birth weight. The results show that the effect of hypobaric hypoxia is reverted with the administration of vitamins C and E. These findings suggest an oxidative stress in pregnancy at high altitude.

INTRODUCCIÓN

El nivel de fertilidad que logra una población depende de su fecundidad y de los factores biológicos y ambientales que aseguran la obtención de descendencia. En la altura el estrés producido por la hipoxia actúa reduciendo la fecundidad, la natalidad y el tamaño de los recién nacidos, en animales, como también en seres humanos.

En la región altoandina del norte de Chile habitan poblaciones humanas cuyo sustento es la ganadería, compuesta por camélidos sudamericanos y ganado ovino criollo, aclimatado a las condiciones locales de hipoxia y semiaridez. Aunque esta última especie se considera adaptada a las rigurosas condiciones medioambientales de la altura, presenta índices reproductivos y productivos inferiores, en comparación a ovinos que se han desarrollado a baja altura, lo que se manifiesta en fertilidad disminuida, menor crecimiento intrauterino, mayores tasas de mortalidad neonatal y crías de menor tamaño y peso corporal (Parraguez *et al.*, 2005).

El adecuado crecimiento intrauterino depende, en parte, del balance de los esteroides ováricos maternos en circulación. En gestaciones ovinas en la altura se describe un aumento en las concentraciones plasmáticas de progesterona, específicamente en ovejas que han vivido por varias generaciones en esta condición (Parraguez *et al.*, 2004).

Varios de los efectos de la altura sobre diversas funciones fisiológicas se han atribuido al estrés oxidativo generado por la hipoxia. Es por esto que en el presente estudio se plantea la suplementación con vitaminas C y E, con el propósito de prevenir los efectos de la hipoxia hipobárica sobre el patrón de esteroides ováricos circulantes durante la gestación.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1) Gestación en la oveja:

Generalidades

La oveja es poliéstrica estacional de días cortos, pudiendo gestar 1 a 4 crías dependiendo de la raza (Jainudeen *et al.*, 2002). El período de gestación es en promedio 147 días, pero se ha observado que este período se prolonga en aproximadamente una semana en ovejas criollas que han vivido por varias generaciones en la altura y que gestan en este ambiente (Parraguez *et al.*, 2005).

Rol de los progestágenos

La progesterona es el progestágeno natural más abundante durante la gestación y es secretada por células lúteas del cuerpo lúteo, la placenta y la glándula suprarrenal. Es transportada en la sangre por una globulina de enlace y su secreción es estimulada principalmente por la hormona luteinizante (LH) (Hafez *et al.*, 2002). En la oveja, las concentraciones plasmáticas de progesterona comienzan a elevarse a 2 a 4 ng/ml aproximadamente a los 10 días post fecundación, permaneciendo constantes hasta el día 80 y volver a aumentar de manera exponencial, llegando a sus máximas concentraciones de entre 12 a 14 ng/ml el día 140 de gestación, para luego ir declinando en la sangre materna entre 5 y 15 días antes del parto (Rutter y Russo, 2002).

En la oveja, la fuente de progesterona durante la primera mitad de la gestación (días 50-60) está a cargo del cuerpo lúteo y posteriormente la placenta pasa a ser su fuente principal (Jainudeen *et al.*, 2002). Algunas de sus funciones son (Rutter y Russo, 2002):

- Suprimir la reiniciación de la actividad cíclica.
- Preparar el endometrio para la implantación del embrión y el mantenimiento de la preñez.
- Aumentar la actividad de las glándulas secretoras endometriales (etapa histotrófica de la nutrición del embrión).
- Mantener la inactividad del miometrio durante la preñez, al inhibir la síntesis de los receptores para los agonistas estrogénicos, suprimiendo la síntesis de prostaglandinas, inhibiendo la liberación de oxitocina por la neurohipófisis y reduciendo la disponibilidad del calcio intracelular.
- Provocar el desarrollo de los alvéolos de la glándula mamaria.

Rol de los estrógenos

El estradiol es el estrógeno biológicamente activo producido por el ovario, junto con cantidades menores de estrona y estriol (Hafez *et al.*, 2002). El sitio principal de la biosíntesis de los estrógenos en la gestación es la placenta, gracias a la acción del cortisol fetal, pudiendo convertir esteroides de C27 (colesterol) a estrógenos y de otras fuentes de precursores, como la androstenadiona y testosterona de la adrenal fetal, debido al aumento de las actividades de las enzimas aromatasa y esteroide sulfatasa en la placenta. La concentración de 17 β -estradiol en el plasma materno es baja durante la gestación y se eleva sólo 24 horas antes del parto. Las acciones fisiológicas del estradiol durante la gestación son (Rutter y Russo, 2002):

- Estimular la actividad miometrial, al incrementar la sensibilidad a los agonistas estrogénicos y aumentar la propagación de la contracción del miometrio.
- Modular a nivel del hipotálamo la expresión del gen para oxitocina.
- Inducir hiperemia y edema del aparato genital de la hembra.
- Relajar la articulación sacroilíaca y los ligamentos del cinturón pelviano.

-Aumentar el tamaño de la glándula mamaria, estimulando el crecimiento de los conductos y el pezón.

Los estrógenos también actúan en el útero incrementando las masas endometrial y miometrial e incrementando la amplitud y frecuencia de las contracciones mediante la potenciación de los efectos de la oxitocina y la prostaglandina F_{2α} (Hafez *et al.*, 2002).

En conjunto, la progesterona y los estrógenos deben asegurar que la irrigación sea adecuada a nivel placentario, promoviendo el crecimiento y el grado de dilatación de los vasos sanguíneos a lo largo de la gestación (Rutter y Russo, 2002).

2) Flujo sanguíneo uterino y desarrollo fetal:

A medida que el feto se desarrolla se va produciendo un progresivo aumento del flujo sanguíneo al útero, que es esencial para el desarrollo y madurez fetal, existiendo una marcada proliferación de los vasos sanguíneos que es mediada por factores placentarios y endometriales. En la oveja esta angiogénesis ocurre dentro del placentoma, el área de intercambio materno-fetal.

El control del flujo sanguíneo uterino es mediado por dos fenómenos distintos: la contracción fásica (corta <10 min) y tónica (mantenida). La primera funciona a través de la activación de receptores adrenérgicos α mediante la exposición a catecolaminas (epinefrina, norepinefrina) y causa vasoconstricción de la musculatura vascular (Ford, 1995).

La progesterona (endógena o exógena) aumenta el número de receptores α_1 en la arteria uterina, manteniendo la contracción fásica de la arteria uterina a través de la gestación. Los estrógenos disminuyen el tono arterial uterino inhibiendo la captación del calcio extracelular (Ford, 1995).

En los recién nacidos humanos existe una relación entre el promedio del peso al nacimiento y la altura, ya que existe una disminución de 100g de peso al nacimiento por cada 1000 m de altura, la cual es menor en los/as hijos/as de mujeres residentes adaptadas a la altura en comparación a aquéllas que llevan menos tiempo de adaptación (Moore, 2003). Esto concuerda con Parraguez *et al* (2004) que describen que los corderos nacidos de madres nativas de la altura en términos absolutos presentan 200 g más de peso al nacimiento que aquéllos nacidos de madres provenientes del nivel del mar y que gestaron en la altura. La restricción del crecimiento intrauterino en la altura es una consecuencia de la reducción de oxígeno que llega al feto y una de sus causas, según Moore (2003), sería un aumento en la incidencia de preeclampsia. Aunque no todos los niños nacidos de madres con preeclampsia presentan restricción del crecimiento intrauterino, se ha concluido que en las gestaciones en la altura la preeclampsia y la hipoxia actúan de manera aditiva, contribuyendo de modo similar a la restricción del crecimiento intrauterino. Además, se piensa que las mujeres que han vivido por varias generaciones en la altura estarían protegidas ante la incidencia de esta patología. Moore (2003) también sugiere que en la altura estarían disminuidos los pesos al nacimiento debido a una restricción intrauterina del crecimiento en el tercer trimestre de gestación y serían el resultado de una disminución del flujo sanguíneo placentario.

3) Gases sanguíneos maternos en la altura:

La gestación aumenta la ventilación materna. Esto se produce por aumento de las necesidades metabólicas y un aumento en la sensibilidad de los receptores carotídeos, que es directamente mediado por la progesterona y los estrógenos. Este aumento en la ventilación disminuye la PaCO₂ y aumenta la PaO₂, pero sin aumentar la saturación de la O₂ Hb arterial en gestaciones a nivel del mar. Lo contrario ocurre en altura donde la hiperventilación aumenta la saturación de O₂Hb (Moore, 2003), lo que concuerda con Fernandois (2004), quien describió que ovejas gestantes propias del alto que gestaron a 3.600 m.s.n.m., mostraron valores absolutos mayores

de O₂Hb en comparación a madres ovinas propias del nivel del mar que gestaron en la misma condición.

La PaO₂, PaCO₂, y la O₂Hb son menores en gestaciones en la altura comparadas con gestaciones a nivel del mar, mientras que el pH, la concentración de hemoglobina y el contenido arterial de oxígeno son mayores. En la altura la saturación de oxígeno y la hemoglobina disminuyen hacia el final de la gestación, resultando en un menor contenido de oxígeno arterial, pero estos cambios no son aparentes en mujeres que han vivido por más de tres generaciones en la altura. El tiempo de residencia en la altura proporciona un beneficio en mantener una buena oxigenación materna hacia el final de la gestación, en donde las demandas del feto son mayores (Mc Auliffe *et al.*, 2001).

4) Hipoxia y reproducción:

En humanos existen evidencias sustanciales que las condiciones ambientales reducen las funciones reproductivas en los recién llegados a altura, pero no está claro que la hipoxia reduzca la fertilidad entre los nativos que residen a gran altura (Vitzthum, 2001). Observaciones de rebaños ovinos en la altura muestran una baja proporción de recién nacidos de ovejas (De Carolis, 1987), lo que sugiere baja fertilidad, baja natalidad o elevada tasa de mortalidad neonatal. Parraguez *et al* (2005) demostraron un menor crecimiento intrauterino y peso al nacimiento en ovinos mantenidos en la altura, lo que podría explicar los hallazgos de De Carolis (1987), debido a que corderos más livianos se asocian con mayor mortalidad.

En un estudio en que se analizó el efecto de la hipoxia sobre las concentraciones plasmáticas de progesterona y 17β-estradiol en ovejas criollas adaptadas y no adaptadas a la altura, se concluyó que la hipoxia de altura incrementa las concentraciones plasmáticas de progesterona durante la gestación en ovinos no adaptados a la altura, mientras que el patrón plasmático de 17β-estradiol no se vió mayormente afectado (Parraguez *et al.*, 2004), probablemente debido a la baja

sensibilidad del ensayo utilizado. Esto concuerda con un estudio realizado por Zamudio *et al* (1994) en el cual se concluyó que la gestación de mujeres a gran altura está asociada con un aumento en progesterona placentaria y una disminución en la síntesis de estrógenos placentarios, lo que también ocurre en gestaciones con preeclampsia. A su vez, la preeclampsia es significativamente más prevalente en embarazos en la altura (Keyes *et al.*, 2003).

Estos cambios de la esteroidogénesis, observados en la preeclampsia, han sido explicados por diversos autores. Jiang *et al* (2000), indican que debido a que en la preeclampsia la placenta se encuentra hipóxica, el estradiol se encontraría disminuido por la baja actividad de la enzima aromatasa P450, que transforma esteroides de 19 C a estrógenos. Adicionalmente, Zamudio *et al* (1994) plantean que la propia disminución del estradiol circulante contribuye un gatillo para un mecanismo de retroalimentación trófico, que haría aumentar la producción de progestágenos precursores de estradiol. Finalmente, Walsh (1988) señala que las placentas preeclámpicas tendrían mayor cantidad y actividad de pregnenolona sulfatasa, por lo que convertirían la pregnenolona sulfato a progesterona con mayor facilidad.

5) Hipoxia y estrés oxidativo.

Los radicales libres son especies químicas que poseen uno o más electrones desapareados en sus orbitales externos. Son generalmente inestables y muy reactivos (Fang *et al.*, 2002). Existen dos tipos de radicales libres, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Agarwal y Gupta, 2005). Ejemplos de ROS son el radical superóxido, hidroxilo u oxidrilo, alkoxilo, peroxilo e hidroperoxilo, mientras que óxido nítrico y el dióxido de nitrógeno son dos ejemplos de RNS (Fang *et al.*, 2002).

La remoción de los radicales libres es realizada a través de reacciones enzimáticas y no enzimáticas. Las enzimas antioxidantes incluyen la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (GPX), glutatión reductasa y la catalasa. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen al glutatión (GSH), las vitaminas C y E, ácido lipoico, los carotenoides, la bilirrubina y la ubiquinona (Fang *et al.*, 2002). La vitamina E (α -tocoferol) es lipofílica y se encuentra en todas las membranas celulares, pero el mayor almacenamiento se encuentra en la membrana mitocondrial, lugar donde ocurre el transporte de electrones. La vitamina C que es soluble en agua y que se encuentra en el citosol de las células, sirve como un donador de electrones para la vitamina E en la membrana celular durante el estrés oxidativo (Evans, 2000).

Cuando ocurre una sobreproducción de radicales libres o una caída en el nivel de las defensas antioxidantes en el organismo, se producirá un desbalance, que podría provocar efectos deletéreos. Esta situación se conoce como estrés oxidativo (Agarwal y Gupta, 2005). Los radicales libres causan daños en el organismo a distintas biomoléculas como lípidos, proteínas, aminoácidos y DNA, ya que éstos participan en un amplio rango de funciones biológicas (Fang *et al.*, 2002).

Existe una asociación entre hipoxia y estrés oxidativo, debido a que la hipoxia induciría la formación de radicales libres, especialmente de ROS. La reducción en la presión barométrica causa una disminución en la presión de oxígeno atmosférico (PO_2), lo que lleva a una disminución de la presión de oxígeno arterial (PaO_2) resultando en hipoxia de los tejidos. Esta disminución de oxígeno desencadenaría distintos fenómenos como la sobrecarga de la cadena transportadora de electrones, lo que resultaría en la formación de radicales superóxido, además, se activaría la xantina oxidasa (XO) por la acumulación de xantina e hipoxantina debido a la falta de oxígeno para la formación de moléculas de ATP y existiría autooxidación de catecolaminas (Askew, 2002). La aumentada producción de ROS bajo estas condiciones agotaría la capacidad antioxidante endógena, estableciéndose el estrés oxidativo.

La mayor incidencia de preeclampsia en embarazos que cursan en la altura, se asocia a una mayor exposición al estrés oxidativo. El endotelio vascular de la placenta es el tejido más afectado en la preeclampsia, ya que existe una disminución de prostaciclina endotelial, disminución del óxido nítrico, aumento de la permeabilidad celular y un aumento de los factores de adhesión moleculares y protrombóticos en el endotelio (Chappell *et al.*, 1999). Los radicales libres han emergido como los más probables promotores del mal funcionamiento de la vasculatura materna en la preeclampsia. En una prueba en la cual se suplementó con vitamina C y E durante la segunda mitad de la gestación a mujeres embarazadas con alto riesgo de padecer preeclampsia, se obtuvieron buenos resultados en reducir los marcadores bioquímicos de la enfermedad (Chappell *et al.*, 1999)

Los efectos del estrés oxidativo, inducido por la hipoxia de altura, podrían ser los responsables de los cambios en la esteroidogénesis placentaria, que llevaría a una disminución del flujo sanguíneo y consecuente disminución de la tasa de crecimiento fetal. Este efecto es parcialmente compensado en ovejas que llevan varias generaciones viviendo en la altura.

En este trabajo se comparó el efecto de la administración de antioxidantes sobre el patrón de progesterona y 17 β -estradiol en ovejas preñadas adaptadas y no adaptadas a la altura.

HIPÓTESIS

La administración de antioxidantes revierte los efectos de la hipoxia hipobárica en los patrones de progesterona y 17 β -estradiol circulantes durante la gestación en la altura.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar los efectos de la suplementación con vitamina C y E sobre las concentraciones plasmáticas de progesterona y 17 β -estradiol en gestaciones que cursan en ambiente hipobárico e hipóxico, en ovejas criollas adaptadas y no adaptadas a la altura.

Objetivos específicos

- Caracterizar el patrón circulante de progesterona y 17 β -estradiol en ovejas criollas preñadas adaptadas y no adaptadas a la altura suplementadas con antioxidantes, durante gestaciones que cursan en la altura.
- Comparar las concentraciones plasmáticas de progesterona y 17 β -estradiol en ovejas criollas gestantes adaptadas y no adaptadas a la altura, con y sin* suplementación de antioxidantes.

* Datos reportados por Roa 2004.

MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se realizó en el Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS) de la Universidad de Chile, ubicado en la localidad de Putre, I región, a una altura de 3600 m.s.n.m. Se utilizó un grupo de ovejas criollas originarias de Putre (n=6) (HH + V) y un grupo de ovejas criollas provenientes del Valle de Lluta (500 m.s.n.m) (n=6) (LH + V) que fueron llevadas a la altura para su encaste y gestación. El peso de las ovejas al inicio de la gestación fue de 37.1 ± 3.1 y 38.8 ± 2.1 kg para los grupos HH+V y LH+V, respectivamente ($p > 0.05$).

Durante todo el periodo de encaste (30 días) y la gestación, las hembras permanecieron en corrales separados según su origen (Foto 1). Ambos grupos recibieron diariamente 2 kg de heno de alfalfa por animal, cantidad de alimento calculado para ovejas en el último tercio de la gestación (NRC, 1985). Junto al forraje se les suplementó vitamina C (500 mg/ animal/día) y vitamina E (350 UI/ animal/día). La dosis suplementada de vitamina E, se calculó en aproximadamente 15 veces el requerimiento de gestación (NRC, 1985), tal como ha sido utilizada previamente en otros experimentos en la especie (Kott *et al.*, 1998). Para el caso de la suplementación con vitamina C, dado que no existe el requerimiento para la especie, se estimó de acuerdo a experimentos en mujeres, de acuerdo al peso corporal (Chappell *et al.*, 2002).

FOTO 1



Corrales

El diagnóstico de gestación se realizó 30 días después del encaste, mediante ecografía transrectal. Aproximadamente a los 60 días de gestación, a los 12 animales se les instalaron catéteres permanentes de silástico (Tygon® O.D.=2.29; I.D.=2.0) en la arteria y vena femoral del miembro posterior izquierdo (Foto 2). En esta cirugía se utilizó como premedicación Atropina (0,04 mg/kg). La inducción anestésica se realizó con Ketamina en bolo (20 mg/kg), seguida de mantención con infusión continua del mismo anestésico (0,02 mg/kg/min).

FOTO 2



Exteriorización de los vasos para instalación de catéteres.

Los catéteres se insertaron en los vasos a nivel del tarso para alcanzar la aorta abdominal y la vena cava caudal. Luego las porciones distales de estos catéteres se llevaron hasta el flanco izquierdo de la oveja a través del tejido subcutáneo y se almacenaron en un bolsillo de lona suturado a la piel. Posterior a la cirugía los animales recibieron una dosis de antibióticos: Penicilina G Benzatina (1.200.000 U.I.) y Penicilina G Sódica (1.000.000 U.I.), además del analgésico Metamizol Sódico (40 mg/kg, IM).

Los catéteres se llenaron con una solución de Heparina 1000 UI /mL. Luego de 6 días de recuperación quirúrgica, se comenzó a extraer cada 3 días hasta el parto muestras de 3 mL de sangre desde el catéter venoso con jeringas heparinizadas, para la medición de las hormonas (Foto 3). Además, se extrajo 1 mL de sangre

desde el catéter arterial y 1ml de sangre desde el catéter venoso para la medición de gases sanguíneos. Al final del periodo gestacional, se obtuvieron muestras de sangre (5 mL) para la medición de las concentraciones plasmáticas de vitamina C y E. Para establecer el efecto de la administración de vitaminas sobre la concentración plasmática de las mismas, se tomaron muestras de sangre de ovejas en las mismas condiciones experimentales, pero que no recibieron suplementación de vitaminas, donde sólo se midieron las concentraciones plasmáticas de vitaminas C y E. Las muestras de sangre para medir hormonas y vitaminas se centrifugaron a 1.200 g x 3 min y el plasma que se obtuvo fue congelado a -20°C y -196°C , respectivamente, hasta su posterior análisis en el laboratorio de Fisiología Animal, de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

FOTO 3



Carro metálico para extracción de muestras.

Las concentraciones de progesterona y 17β -estradiol plasmáticas se midieron mediante radioinmunoanálisis de fase sólida, utilizando kits comerciales (Coat-A-Count, Diagnostic Products Corporation, Los Ángeles, Ca., USA.) y un contador gamma (New England Nuclear, modelo NE 1612 turbo). Las concentraciones de vitaminas C y E se midieron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), seguida de detección electroquímica y fluorescencia, respectivamente. La vitamina C

se determinó de acuerdo al protocolo entregado por Pachla y Kissinger (1994), en tanto que la vitamina E se midió de acuerdo al protocolo de Zhao *et al* (2004).

Adicionalmente, con el propósito de conocer el grado de aclimatación de los animales a la hipoxia hipobárica durante el curso del experimento, se realizaron mediciones de presión parcial de oxígeno (PO_2), dióxido de carbono (PCO_2), pH, volumen globular aglomerado (V.G.A.), concentración de hemoglobina (THb) y porcentaje saturación de hemoglobina por oxígeno (O_2Hb), inmediatamente después de cada extracción, mediante un analizador de gases sanguíneos y co-oxímetro (Instrumentation Laboratory modelo IL Synthesis 25 Lexington, Ma., U.S.A.; Foto 4) calibrado a la presión barométrica local (480 mmHg) y temperatura corporal de la oveja ($38,5^\circ$), el cual trabaja con un volumen de 0,3 ml de muestra para realizar el análisis de las variables sanguíneas mencionadas.

FOTO 4



Analizador de gases sanguíneos y co-oxímetro

Análisis de resultados

Los resultados para cada hormona se promediaron de acuerdo al grupo y a los rangos de edad gestacional. Los valores se sometieron a un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía para medidas repetidas con el fin de establecer las diferencias entre edad gestacional y grupos. Posteriormente se aplicó el método de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer para especificar en cuáles rangos de tiempo de gestación se produjeron las diferencias (SAS*). Los resultados del presente estudio fueron adicionalmente comparados con las mismas herramientas estadísticas, con los obtenidos por Roa (2004), quien utilizó el mismo diseño experimental, con animales de iguales características etéreas y fenotípicas e igual manejo, pero en ausencia de administración de vitaminas antioxidantes.

Los resultados se expresaron como promedio \pm D.E. y las diferencias se consideraron significativas cuando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Las gestaciones duraron en promedio $150 \pm 4,36$ días en las ovejas propias de la altura y $151 \pm 2,12$ días en las provenientes del nivel el mar ($p>0,05$).

Concentraciones plasmáticas de vitaminas C y E

1) Vitamina C

En el grupo de ovejas HH+V las concentraciones plasmáticas de vitamina C fueron de $4,2 \pm 0,9$ $\mu\text{g/mL}$ y en el grupo LH+V de $4,3 \pm 0,6$ $\mu\text{g/mL}$ ($p>0,05$).

2) Vitamina E

En el grupo de ovejas HH+V las concentraciones plasmáticas de vitamina E fueron de $1,8 \pm 0,2$ $\mu\text{g/mL}$ y de $1,5 \pm 0,3$ $\mu\text{g/mL}$ para el grupo LH+V ($p>0,05$).

Concentraciones de hormonas esteroidales ováricas

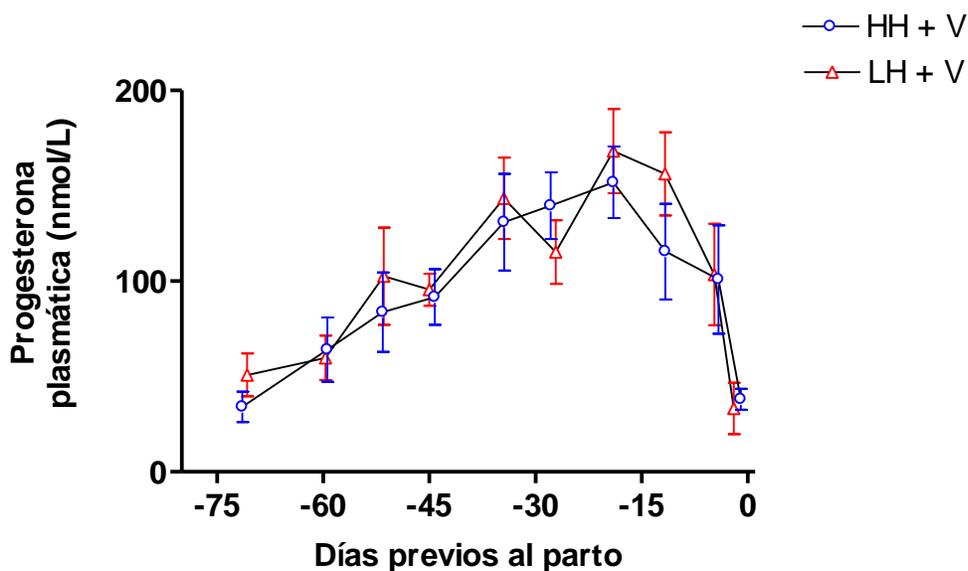
1) Progesterona Plasmática

En la figura 1 se observan los patrones de las concentraciones plasmáticas de progesterona de las ovejas propias de la altura suplementadas con vitaminas antioxidantes (HH+V) y el de las ovejas subidas a gestar a la altura suplementadas con vitaminas antioxidantes (LH+V). Se puede apreciar que las concentraciones plasmáticas de esta hormona comienzan a elevarse a medida que avanza la gestación, llegando a sus máximos valores de $131 \pm 37,6$ nmol/L para las ovejas HH+V y de $155,4 \pm 49,5$ nmol/L para las LH+V entre los 15 y 30 días previos al parto, para luego disminuir sus concentraciones plasmáticas a medida que se acerca la

fecha del parto. Además, los promedios de la hormona en cada rango de edad gestacional, no fueron distintos entre los grupos ($p>0,05$).

FIGURA 1

Concentraciones plasmáticas de progesterona en ovejas criollas de la altura (HH+V) y del bajo (LH+V) tratadas con vitaminas antioxidantes, que gestaron a 3.600 m.s.n.m.



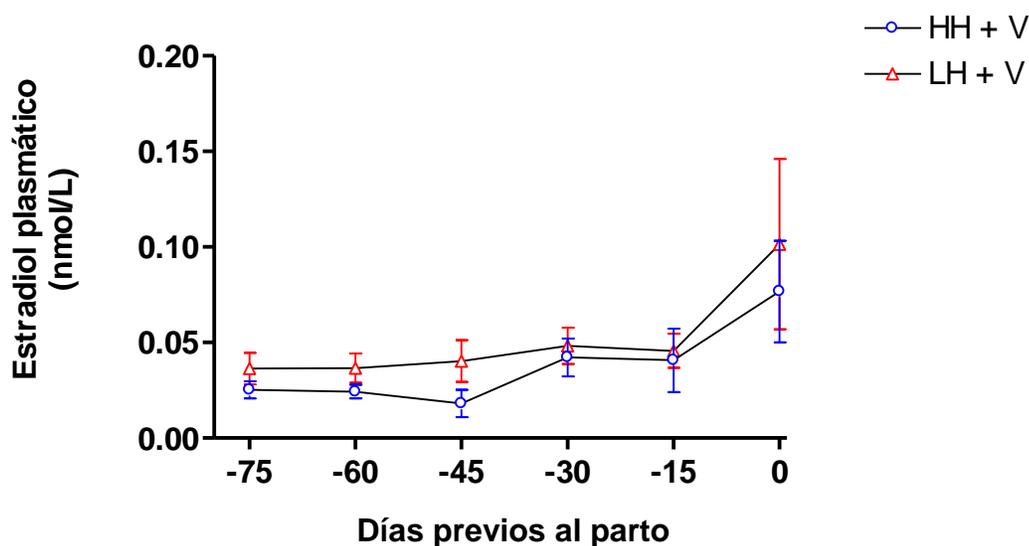
2) Estradiol Plasmático

En la figura 2 se observan las concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol, las cuales permanecieron muy bajas durante todo el período en estudio con concentraciones que van desde los $0,02 \pm 0,01$ nmol/L para las ovejas a HH+V y $0,03 \pm 0,02$ nmol/L para las ovejas LH+V hasta 15 días previos al parto, para luego aumentar abruptamente en los días cercanos al parto y llegar a los valores máximos de $0,07 \pm 0,06$ nmol/L para el grupo HH+V y de $0,10 \pm 0,01$ nmol/L para los animales LH+V el día del parto.

Aunque en el gráfico los valores para esta hormona se muestran más elevados en el grupo LH+V en comparación a los animales del grupo HH+V, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p>0,05$).

FIGURA 2

Concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol (nmol/L) en ovejas criollas gestantes de la altura (HH+V) y del bajo (LH+V) suplementadas con antioxidantes, que gestaron a 3.600 m.s.n.m.



Variables sanguíneas

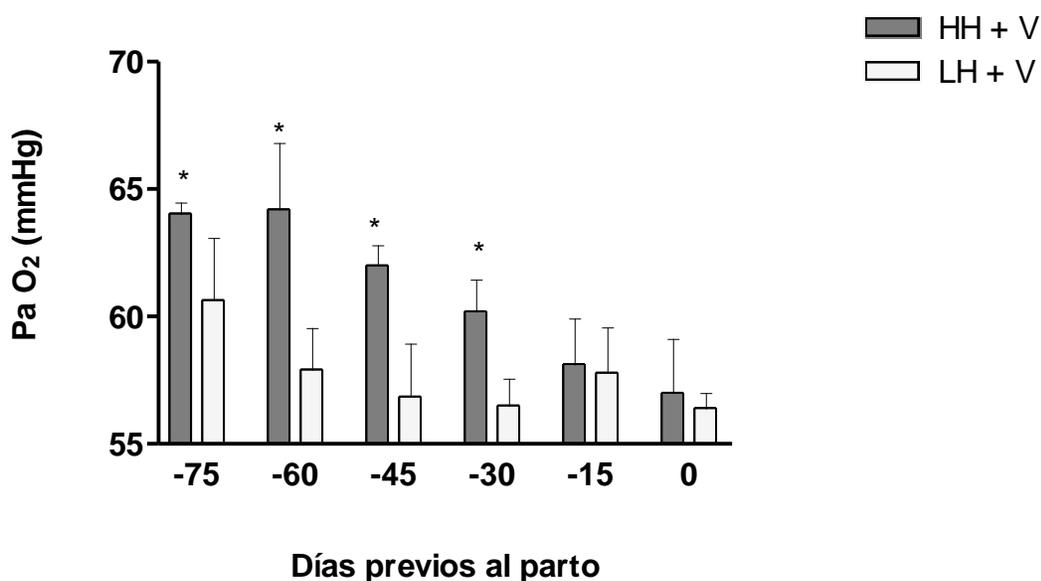
1) Presión Parcial de Oxígeno Arterial (PaO_2)

Las PaO_2 pertenecientes a los animales HH+V fueron en promedio mayores durante todo el tiempo en estudio en comparación a los LH+V ($p<0,05$). Además, en la figura 3 se observa que esta variable sanguínea va disminuyendo sus valores a medida que se acerca la fecha del parto en los 2 grupos de animales. De acuerdo al gráfico los valores máximos de PaO_2 en el grupo HH+V fueron alcanzados 60 días

previos al parto ($64,21 \pm 3,63$ mm Hg) y sus valores mínimos se presentaron el día del parto ($57 \pm 5,24$ mm Hg). En los animales LH+V sus valores máximos se presentaron 75 días previos al parto ($60,64 \pm 6,04$ mm Hg) y los valores mínimos ($56,40 \pm 1,51$ mm Hg) el día del parto.

FIGURA 3

Presión parcial de oxígeno arterial en ovejas criollas de la altura (HH+V) y del nivel del mar (LH+V), tratadas con antioxidantes, en gestaciones a 3.600 m.s.n.m.



* Diferencias estadísticas significativas entre grupos ($p < 0,05$).

2) Presión Parcial de CO₂ Arterial (PaCO₂)

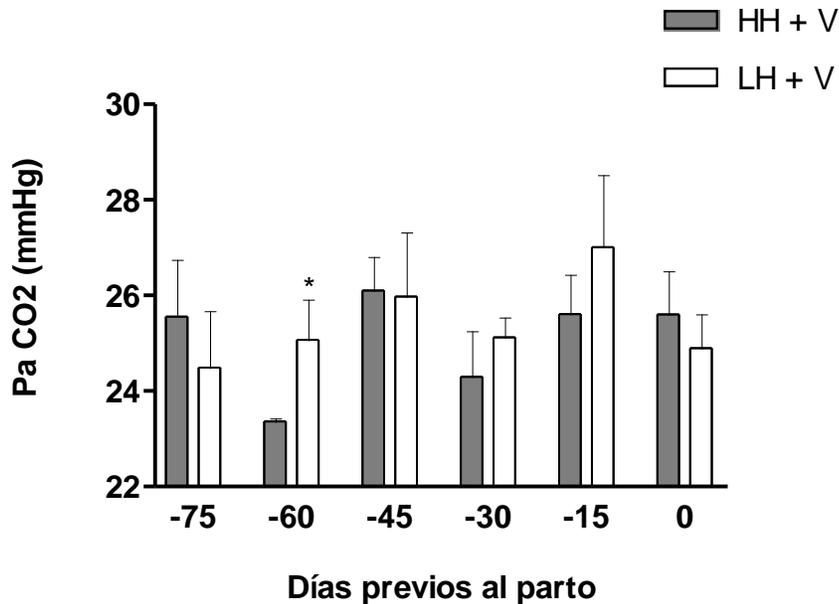
Los promedios para esta variable fueron similares en el grupo LH+V en comparación al grupo HH+V. En la figura 4 se puede observar que los valores mínimos fueron $23,36 \pm 0,81$ mm Hg para el grupo HH+V 60 días previos al parto y de $24,49 \pm 2,92$ mm Hg para las ovejas LH+V, en tanto que los valores máximos fueron de $26,1 \pm$

1,75 mm Hg 45 días antes del parto para el grupo HH+V y de $27,01 \pm 3,73$ mm Hg 15 días previos al parto para las ovejas LH+V.

En general, los valores para la PaCO₂ no mostraron variaciones durante el tiempo en estudio y las diferencias entre los 2 grupos de animales no fueron estadísticamente significativas ($p > 0,05$), con excepción de la PaCO₂ del grupo HH+V registrados el día -60 que fue menor que el resto de los valores ($p < 0,05$).

FIGURA 4

Presión parcial de dióxido de carbono arterial en ovejas criollas de la altura (HH+V) y del nivel del mar (LH+V), tratadas con antioxidantes, en gestaciones a 3.600 m.s.n.m.



* Diferencias estadísticas significativas entre grupos ($p < 0,05$).

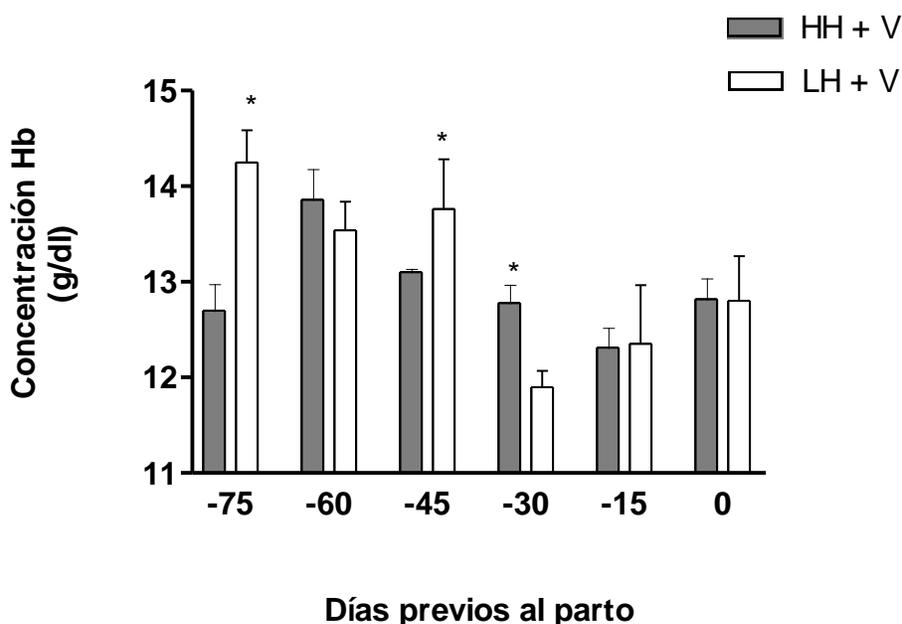
3) Concentración de Hemoglobina (Hb)

En la figura 5 se observa que la concentración máxima de Hb alcanzada por los animales HH+V se evidenció 60 días previos al parto ($13,86 \pm 0,80$ g/dl) y la mínima ($12,31 \pm 0,53$ g/dl) 15 días previos al parto. En el grupo de animales LH+V las concentraciones máximas se presentaron 75 días previos al parto ($14,25 \pm 0,82$ g/dl), en tanto que las mínimas ($11,9 \pm 0,41$ g/dl) 30 días previos al parto.

El promedio de la concentración de Hb de todo el período de estudio fue mayor en los animales LH+V comparado con los HH+V ($p < 0,05$).

FIGURA 5

Concentración de hemoglobina en ovejas criollas de la altura (HH+V) y del nivel del mar (LH+V), tratadas con vitaminas antioxidantes, en gestaciones a 3.600 m.s.n.m.



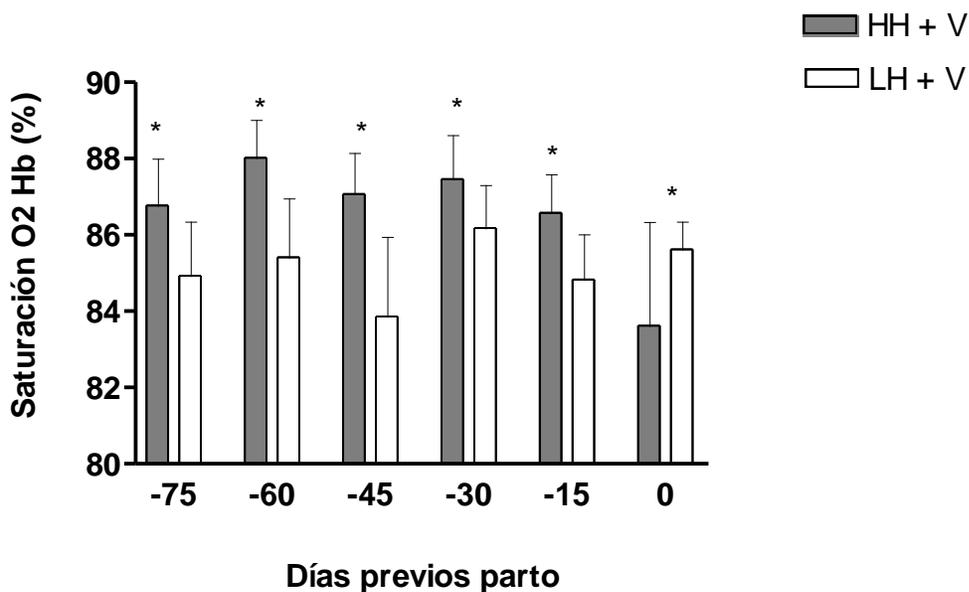
* Diferencias estadísticas significativas entre grupos ($p < 0,05$).

4) Saturación de Hemoglobina por Oxígeno

En la figura 6 se presenta la saturación de Hb por O₂ y se puede apreciar que el grupo HH+V presentó valores mayores al grupo LH+V en todo el tiempo en estudio, excepto en el período cercano al parto ($p < 0,05$). Los valores máximos del grupo HH+V ($88,02 \pm 2,74\%$) se obtuvieron 60 días previos al parto y los mínimos ($83,62 \pm 6,7\%$) el día del parto, en tanto que los valores máximos ($86,18 \pm 2,8\%$) para los LH+V se presentaron 30 días previos al parto y los mínimos ($83,86 \pm 5,15\%$) 45 días previos al parto.

FIGURA 6

Saturación de hemoglobina por oxígeno en ovejas criollas de la altura (HH+V) y del nivel del mar (LH+V), tratadas con antioxidantes, que gestaron a 3.600 m.s.n.m.



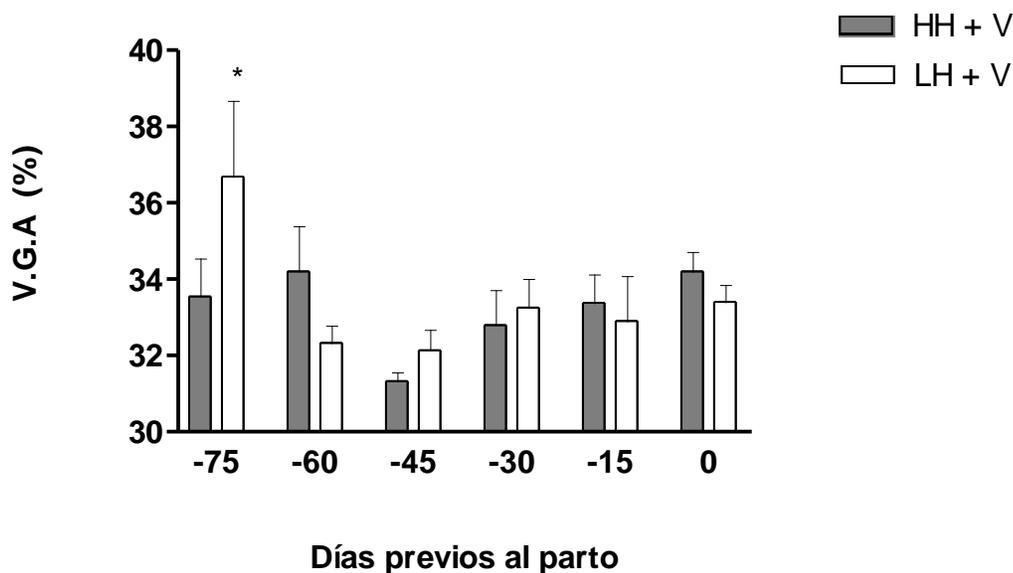
* Diferencias estadísticas significativas entre grupos ($p < 0,05$).

5) Volumen globular aglomerado (V.G.A.)

En la figura 7 se puede observar que los valores de V.G.A. mostraron variabilidad durante todo el tiempo en estudio en los dos grupos de animales, observándose un descenso en el V.G.A. 45 días previos al parto en ambos grupos en estudio. Los valores máximos alcanzados para el grupo LH+V se obtuvieron 75 días previos al parto y fueron de $36,69 \pm 4,89\%$ y para el grupo HH+V los valores máximos fueron de $34,20 \pm 2,95\%$ y se presentaron 60 días previos al parto. Los valores mínimos para el grupo LH+V se presentaron 45 días previos al parto y fueron de $32,14 \pm 1,35\%$, para el grupo HH+V los mínimos fueron de $31,33 \pm 0,58\%$ y se evidenciaron también 45 días antes del parto. No se encontraron diferencias significativas en los valores entre un grupo y otro ($p > 0,05$).

FIGURA 7

V.G.A. en ovejas criollas de la altura (HH+V) y del nivel del mar (LH+V) suplementadas con vitaminas antioxidantes, que gestaron a 3.600 m.s.n.m.



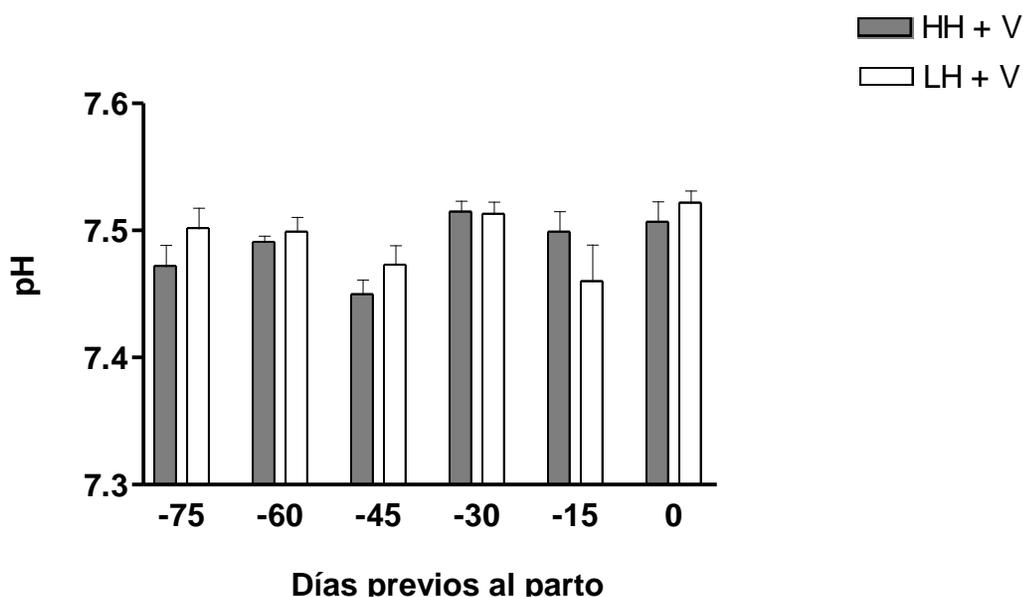
* Diferencias estadísticas significativas entre grupos ($p < 0,05$).

6) pH Sanguíneo

La figura 8 muestra los valores de pH sanguíneo obtenido durante el período en estudio. Estos valores oscilaron entre los $7,45 \pm 0,02$ y los $7,52 \pm 0,02$, los valores se mantuvieron estables a lo largo de la gestación, sin encontrar diferencias entre ambos grupos ($p > 0,05$).

FIGURA 8

pH sanguíneo en ovejas criollas de la altura (HH+V) y del bajo (LH+V) suplementadas con vitaminas antioxidantes, que gestaron a 3.600 m.s.n.m.



Peso al Nacimiento

El peso al nacimiento promedio de los animales cuyas madres eran propias de la altura fue de $4,08 \pm 0,82$ kg, mientras que el de los corderos cuyas madres provenían del nivel del mar y que gestaron en la altura fue de $4,31 \pm 0,78$ kg ($p > 0,05$).

DISCUSIÓN

La exposición a la altura genera diversos cambios fisiológicos los que se hacen más evidentes en organismos que llevan menos tiempo de adaptación en comparación a los que han habitado por generaciones en esta condición. Uno de los estados fisiológicos de mayor riesgo al exponerse a la altura es la gestación, debido a que durante la preñez existe un mayor grado de respuesta frente a la hipoxia hipobárica, con el objeto de mantener adecuados niveles de oxígeno para el normal desarrollo fetal. Como se ha visto en diversos estudios anteriormente mencionados (De Carolis 1987; Moore 2003; Parraguez *et al*, 2005) la adaptación a la altura se ve reflejada en bajos índices reproductivos y productivos en comparación a gestaciones que se desarrollan a nivel del mar.

Los resultados de este estudio mostraron que no hay diferencias de concentración de progesterona y 17β -estradiol en ovejas que gestaron a 3.600 m.s.n.m. tratadas con vitaminas C y E, independiente de su tiempo de adaptación a la altura. Sin embargo, al compararlas con ovejas que no han recibido antioxidantes (Roa, 2004) se puede observar que sí hay diferencias. En cuanto a las concentraciones plasmáticas de progesterona, las comparaciones establecieron que la administración de antioxidantes aumenta sus valores en los grupos de ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura. El patrón de esta hormona permanece similar y las máximas concentraciones para los grupos a los que se les administraron antioxidantes y los que no, se alcanzaron dentro de los 15 a 30 días previos al parto. Los resultados de progesterona no fueron diferentes entre los dos grupos de animales tratados con vitaminas antioxidantes, sin embargo, comparado con los datos reportados por Roa (2004), los dos grupos de animales sin tratamiento antioxidante muestran diferencias significativas en sus valores de progesterona lo que sugiere que la administración de antioxidantes, además de aumentar las concentraciones de progesterona plasmática, haría desaparecer las diferencias entre los animales adaptados y no adaptados a la altura.

Además, al comparar los datos de este estudio y los de Roa (2004) con los de Moore *et al* (1972) y Rutter y Russo (2002) quienes describieron las concentraciones de progesterona en ovejas gestantes a nivel del mar, se observa que las concentraciones plasmáticas de esta hormona en la altura son evidentemente mayores que las de ovejas gestantes a nivel del mar.

Al comparar las concentraciones de 17β -estradiol encontradas en este estudio con los datos reportados por Roa (2004), se evidencia que las concentraciones plasmáticas siguen el mismo patrón en los grupos de animales tratados y no tratados con vitaminas antioxidantes. En conjunto, los datos muestran que la administración de antioxidantes aumenta las concentraciones plasmáticas de esta hormona en animales adaptados y no adaptados a la altura. En cuanto a los datos entregados por Roa (2004), las concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol fueron levemente menores en el grupo de animales subidos a gestar a la altura, situación inversa a lo observado en animales con administración de vitaminas antioxidantes.

Lo anterior podría ser en parte explicado porque la placenta, tiene la capacidad de aromatizar esteroides de $19C$ a estrógenos por la enzima aromatasa P450 en las células sincitiotrofoblásticas. En un estudio *in vitro*, en que las células citotrofoblásticas humanas se expusieron a ambiente hipobárico (2% de oxígeno), no se produjo la fusión sincitiotrofoblástica y la expresión de RNAm de la aromatasa P450 permaneció baja, lo que sugiere que la vascularización placentaria y el aporte de oxígeno son críticos para la producción placentaria de estrógenos durante la gestación, además, en enfermedades asociadas a la gestación como la preeclampsia en la cual la placenta se encuentra relativamente hipóxica el tejido citotrofoblástico no se diferencia y la disponibilidad de oxígeno para la producción hormonal esta disminuida (Jiang *et al.*, 2000). Estas gestaciones, además, están asociadas con aumentos en la síntesis de progesterona y baja síntesis de estradiol (Jiang *et al.*, 2000). En un reporte de Zamudio *et al* (1994), quienes realizaron un estudio en mujeres que gestaron a 3.100 m.s.n.m. comparadas con mujeres que gestaron a 1.600 m.s.n.m., se concluyó que la disminución de oxígeno placentario a gran altura disminuye la actividad de la aromatasa placentaria, limitando la síntesis de

estrógenos. Además, se encontró que las mujeres que gestaron a 3100 m tendrían mayor cantidad de progesterona y una mayor prevalencia de preeclampsia. Estos cambios observados coinciden con los resultados obtenidos por Roa (2004), en donde se evidenciaron mayores concentraciones de progesterona y menores cantidades de estradiol en el grupo de ovejas no adaptadas en comparación a los animales propios de la altura, corroborando que en gestaciones en la altura existe una mayor producción de progesterona y menor cantidad de estradiol en individuos no adaptados a la altura.

Al comparar los datos de este estudio con los de Roa (2004), llama la atención que el efecto de los antioxidantes, además de aumentar las concentraciones plasmáticas de 17β -estradiol, también aumenta las de progesterona. A la luz de la información presente en la literatura, es difícil explicar con precisión el mencionado efecto. Sin embargo, se puede especular que los antioxidantes mejorarían la actividad de las enzimas que participan en vías esteroidogénicas desde colesterol a progesterona. Es probable que el paso limitante corresponda a la enzima P450_{scc}, que lleva a la producción de pregnenolona a partir de colesterol (Rutter y Russo, 2002).

La preeclampsia es un síndrome clínico caracterizado por hipertensión con disfunción orgánica múltiple, proteinuria y edema. Se cree que es un trastorno endotelial que resulta de una perfusión deficiente de la placenta y está asociado con restricción de crecimiento y muerte intrauterina (Raijmakers *et al.*, 2004). La mayoría de sus causas son desconocidas, pero se piensa que el estrés oxidativo sería un factor fundamental en el desarrollo de la enfermedad, ya que las concentraciones de vitaminas C y E en el plasma materno se encuentran disminuidas y en la placenta existe un aumento de radicales libres y una disminución de las enzimas antioxidantes (Chappell *et al.*, 2002). Los efectos deletéreos de los radicales libres que incluyen peroxidación lipídica, daño oxidativo de biomoléculas y disfunción celular, iniciarían la disfunción del endotelio vascular materno y la activación de leucocitos en la preeclampsia (Raijmakers *et al.*, 2004). Durante una gestación normal, el evento más importante es el establecimiento de una buena circulación placentaria, al iniciarse el flujo sanguíneo a la placenta comienza el aumento de la tensión de oxígeno local y el

aumento en la actividad de varias enzimas antioxidantes. Una disminución de la respuesta antioxidante podría conducir al estrés oxidativo que llevarían a la degeneración trofoblástica y posiblemente contribuirían a defectos en la vascularización en la preeclampsia (Rijmakers *et al.*, 2004). Como se mencionó previamente en este estudio, la hipoxia induciría la formación de radicales libres, especialmente de ROS (Askew, 2002), lo que agotaría la capacidad antioxidante endógena, estableciéndose el estrés oxidativo. Es por esto que en la altura existe una mayor prevalencia de gestaciones que cursan con preeclampsia (Keyes *et al.*, 2003). Zamudio *et al* (1994), describieron que en la altura las gestaciones con hipertensión son más frecuentes que a nivel del mar y éstas se caracterizan por tener bajas concentraciones plasmáticas de estradiol y altas concentraciones de progesterona. Esto se debería a que el bajo contenido de oxígeno que llegaría a la placenta podría hacer disminuir la actividad de la enzima aromatasa que es la encargada de transformar la androstenediona a estrona, la que posteriormente se transforma a estradiol, por lo tanto, la cantidad de este último estaría disminuida. Además, Zamudio *et al* (1994) plantean que la progesterona estaría aumentada en las placentas con preeclampsia debido a que la baja cantidad de estradiol gatillaría un mecanismo de retroalimentación trófico que aumentaría la producción de progesterona para aumentar la cantidad de precursores de estrógeno. Esta alza de progesterona y disminución en la síntesis de estradiol concuerdan con los datos entregados por Roa (2004) y que previamente se mencionaron en este estudio. Además, en un estudio realizado por Walsh (1988), se concluyó que las placentas con preeclampsia tendrían mayor cantidad de pregnenolona sulfatasa, por lo que convertirían la pregnenolona sulfato a progesterona con mayor facilidad, lo que podría ser otra explicación para el aumento de progesterona en las gestaciones en la altura. En este estudio se evidenció que los antioxidantes podrían revertir los efectos de la altura sobre las concentraciones plasmáticas de progesterona y 17β -estradiol, lo que podría ser explicado porque las vitaminas C y E actúan de manera sinérgica, ya que la vitamina E es considerada esencial en prevenir la peroxidación lipídica y la vitamina C actúa regenerando la vitamina E oxidada, es por esto que

serían fundamentales en prevenir la preeclampsia (Chappel *et al*, 2002) y por lo tanto, los trastornos en la esteroidogénesis que conlleva esta enfermedad.

Corroborando la idea anterior, se ha propuesto que existe una asociación entre el estrés oxidativo placentario y la disfunción vascular en la preeclampsia. La generación de radicales libres a través de la XO o NAD(P)H oxidasa en la placenta conducirían a la activación de neutrófilos maternos, lo que llevaría a la activación de estas enzimas en la circulación materna y la liberación de superóxido (Chappell *et al*, 1999). Un potencial estímulo para la activación de la NAD(P)H oxidasa en la preeclampsia es la aumentada sensibilidad a la Angiotensina II, la que genera ROS. La capacidad antioxidante estaría disminuida en la circulación materna, ya que mujeres con preeclampsia tienen menor cantidad de glutatión en el plasma y la alteración lipídica en la preeclampsia sería responsable de la menor cantidad de vitamina E. Además, la cantidad de vitamina C en el plasma materno también estaría disminuída. La vitamina E inhibiría directamente la actividad de la NAD(P)H oxidasa a través de la inhibición de la proteína quinasa C (PKC), es por esto que una suplementación con vitaminas C y E a mujeres con preeclampsia disminuye los marcadores bioquímicos de la enfermedad (Rijmakers *et al*, 2004). Además, la vitamina C es un potente removedor de radicales superóxido y ayuda a mantener las concentraciones de glutatión (Chappell *et al*, 1999).

Por otra parte, Kim *et al* (2005), encontraron que los biomarcadores como el 8-hidroxideoxiguanosina (8-OH-dG) producto del daño oxidativo al DNA y el malondialdeído (MDA), residuo de la peroxidación de lípidos, se encontraban aumentados en la orina de mujeres que tuvieron recién nacidos prematuros en comparación a mujeres con gestaciones normales, determinando que estos biomarcadores estaban inversamente relacionados con el peso al nacimiento. Los mecanismos de cómo actuaría el estrés oxidativo reduciendo el peso al nacimiento sería que alterarían el flujo sanguíneo uterino, lo que conduciría a una disminución del contenido de oxígeno que llegaría al feto. Como las madres utilizan un mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo en la gestación, el cuál está compuesto por enzimas antioxidantes y nutrientes en los cuales se incluyen las

vitaminas C y E, esta idea se asocia con lo propuesto por Lee *et al* (2004), quienes encontraron que las concentraciones plasmáticas de vitamina C en mujeres embarazadas durante el segundo trimestre de gestación estaban positivamente correlacionados con los pesos al nacimiento de los recién nacidos. Además, estos autores sugieren que las concentraciones plasmáticas de vitaminas C y E juntas en el plasma materno representarían mejor el estatus de antioxidantes en la gestación, ya que estas vitaminas, como se mencionó previamente, actuarían de manera sinérgica ante el estrés oxidativo, sugiriendo que la suplementación con vitaminas C y E sería beneficioso para el desarrollo fetal.

Lo anterior podría ser una explicación para los pesos al nacimiento encontrados en este estudio, ya que demostraron ser mayores que los encontrados por Parraguez *et al* (2005), quienes determinaron que los pesos al nacimiento en corderos de ovejas que gestaron a 3600 m.s.n.m. fueron de $3,2\pm 0,8$ kg para ovejas adaptadas a la altura y de $3,0\pm 0,5$ kg para ovejas provenientes del bajo que gestaron en la altura.

Por otra parte, el gasto cardíaco aumenta 40% durante la gestación a nivel del mar, debido a una disminución en la resistencia vascular sistémica que produce vasodilatación y retención de líquido que llevan a la expansión del volumen sanguíneo. La disminución de la resistencia vascular sistémica se debe a muchos factores, como el aumento del NO sistémico (Moore, 2003). Esto concuerda con Rosenfeld *et al* (1996) quienes determinaron que los estrógenos, a través de la estimulación de la síntesis de NO endotelial, aumentan el flujo sanguíneo uterino y el gasto cardíaco, además, disminuyen la resistencia vascular sistémica en ovejas gestantes. La expansión del volumen sanguíneo involucra tanto a los estrógenos como a alteraciones en la actividad adrenérgica. Esta respuesta sistémica circulatoria está alterada en la altura. El gasto cardíaco es menor en gestaciones en altura, ya que la resistencia vascular sistémica se encuentra aumentada, probablemente por disminución del NO (Moore, 2003). Esta también podría ser una explicación de los mayores pesos al nacimiento encontrados en este estudio en comparación a los datos entregados por Parraguez *et al* (2005), ya que como los estrógenos se encontraron aumentados en comparación a ovejas que gestaron en la misma

condición, pero sin la administración de antioxidantes y éstos contribuyen a disminuir la resistencia vascular sistémica en la gestación, un mayor volumen sanguíneo llegaría al útero gestante, lo que aumentaría el contenido de oxígeno y otros nutrientes al feto.

En cuanto a las variables sanguíneas, es posible mencionar que en este trabajo las saturaciones de hemoglobina por oxígeno, si bien fueron menores el día del parto, estas se mantuvieron relativamente constantes durante todo el tiempo en estudio en ambos grupos de animales, y fueron mayores comparadas con los datos entregados por Roa (2004), quien describió que en los grupos de ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura que gestaron a 3.600 m.s.n.m. sin la administración de vitaminas antioxidantes, las saturaciones de hemoglobina por oxígeno descendieron mientras se acercaba la fecha del parto en los dos grupos de animales, siendo más evidente la disminución en el grupo de ovejas no adaptadas a la altura. Consistente con lo anterior, Mc Auliffe *et al* (2001) determinaron que en mujeres gestantes en la altura la saturación de hemoglobina por oxígeno y la cantidad de hemoglobina descienden hacia el final de la gestación, cuando el feto tiene mayores requerimientos, resultando en una disminución de oxígeno arterial y, por lo tanto, menor cantidad de oxígeno disponible para el desarrollo fetal. Sin embargo, estos cambios no fueron evidentes en mujeres adaptadas a las condiciones de hipoxia hipobárica, ya que mantenían su oxigenación constante durante toda la gestación, en comparación a mujeres que han vivido en la altura por menos de tres generaciones.

En las gestaciones en la altura el pH se encuentra aumentado levemente en comparación a gestaciones a nivel del mar, este estado alcalino facilitaría la excreción de ácidos fetales, generando una adecuada gradiente que disminuye la afinidad de la hemoglobina de la madre por el oxígeno, aumentando la captación de oxígeno por parte del feto (Mc Auliffe *et al.*, 2001). Esto concuerda con los datos entregados en este estudio, ya que ambos grupos de animales presentaron un pH sanguíneo levemente alcalino.

En conclusión, en la gestación debe existir un adecuado balance entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes. En un ambiente hipobárico e hipóxico este balance se pierde favoreciendo la formación de radicales libres y provocando las consecuencias anteriormente mencionadas en este estudio. Reforzando las defensas antioxidantes propias del organismo se podrían combatir los efectos deletéreos del exceso de radicales libres en la gestación en la altura, disminuyendo las diferencias entre animales adaptados y no adaptados a esta condición.

CONCLUSIONES

- 1) La suplementación con vitaminas C y E a ovejas gestantes adaptadas y no adaptadas a la altura que gestaron a 3.600 m.s.n.m. inducen un incremento en las concentraciones plasmáticas de progesterona y 17 β -estradiol en comparación a ovejas gestantes bajo las mismas condiciones, pero sin la administración de antioxidantes.
- 2) Los antioxidantes revertirían las diferencias en las concentraciones plasmáticas de progesterona y 17 β -estradiol registrados previamente en ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura que gestaron en ambiente hipobárico e hipóxico (3.600 m.sn.m.).
- 3) Los resultados de este estudio confirmarían que la gestación en la altura provoca estrés oxidativo, lo cual podría ser prevenido con la administración de vitaminas C y E.

BIBLIOGRAFÍA

- **AGARWAL, A.; GUPTA, S.** 2005. Role of reactive oxygen species in female reproduction. Part I. Oxidative stress: a general overview. *AgroFOOD Ind. Hi-Tech.* 16:21-25.
- **ASKEW, E.W.** 2002. Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients. *Toxicology* 180: 107-119.
- **CHAPPELL, L.C.; SEED, P.T.; BRILEY, A.L.; KELLY, F.J.; LEE, R.; HUNT, B. J.; PARMAR, K.; BEWLEY, S.J.; SHENNAN, A.H.; STEER, P.J.; POSTON, L.** 1999. Effect of antioxidants on the occurrence of pre-eclampsia in women at increased risk: a randomized trial. *Lancet* 354:810-816.
- **CHAPPELL, L.C; SEED, P.T; KELLY, F.J.; BRILEY, A.; HUNT, B.J.; CHARNOCK-JONES, S.; MALLETT, 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.* 187:777-84.
- **DE CAROLIS, G.** 1987. Descripción de un sistema ganadero y hábitos alimentarios de camélidos domésticos y ovinos en el bofedal de Parinacota. Memoria para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. Fac. de Cs. Agrarias y Forestales. U. de Chile. 261 p.
- **EVANS, J.E.** 2000. Vitamin E, vitamin C, and exercise. *Am. J. Nutr.* 72:647s-652s.
- **FANG, Y-Z.; YANG, S.; WU, G.** 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18:872-879.
- **FERNANDOIS, J.** 2004. Efecto de la hipoxia hipobárica en variables sanguíneas durante la gestación en la hembra y feto ovino: comparación entre ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura. Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario. Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 54p.
- **FORD, S.P.** 1995. Control of blood flow to the gravid uterus of domestic livestock species. *J. Anim. Sci.* 72:1852-1860.

- **JAINUDEEN, M.R.; WAHID, H.; HAFEZ, E.S.E.** 2002. Ovejas y cabras. En: Hafez, B.; Hafez, E.S.E. (Eds).Reproducción e Inseminación artificial en animales. 7ª ed. Ed .Mc Graw Hill. Inter. Ed. S.A. Atlampa. México. Pp 177-187.
- **KOTT, R.W.; THOMAS V.M.; HATFIELD, P.G.; EVANS, T.; DAVIES, K.C.** 1998. Effects of dietary vitamin E supplementation during late oregnancy on lamb mortality and ewe productivity. J. Am. Vet. Med. Assoc. 212:997-1000.
- **HAFEZ, E.S.E.; JAINUDEEN, M.R.; ROSNINA. Y.** 2002. Hormonas, factores de crecimiento y reproducción. En: Hafez, B.; Hafez, E.S.E. (Eds). Reproducción e Inseminación artificial en animales. 7ª ed. Ed .Mc Graw Hill. Inter. Ed. S.A. Atlampa. México. Pp 33-55.
- **JIANG, B.; KAMAT, A.; MENDELSON, C.R.** 2000. Hypoxia prevents induction of aromatase expression in human trophoblast cells in culture: Potential inhibitory role of the hypoxia-inducible transcription factor mash-2 (Mammalian Achaete-Scute Homologous Protein-2). Molec. Endocr.14: 1661-1673.
- **KEYES, L.E.; ARMAZA, F.; NIERMEYER, S.; VARGAS, E.; YOUNG, D.A.; MOORE, L.G.** 2003. Intrauterine growth restriction, preeclampsia, and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. Pediatr. Res. 54:20-25.
- **KIM, Y-J.; HONG, Y-CH.; LEE, K-WW.; PARK, H-J.; PARK, E.A.; MOON, H-S.; HA, E-H.** 2005. Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction. Reprod. Tox. 19: 487-492.
- **LEE, B.E.; HONG, Y.C.; LEE, K.H.; KIM, Y.J.; KIM, W.K.; CHANG, N.S.; PARK, E.A.; PARK, H.S.; HANN, H.J.** 2004. Influence of maternal serum levels of vitamins C and E during the second trimester on birth weigth and length. Europ. J. Clin. Nutr.58:1365-71.
- **Mc AULIFFE, F.; KAMETAS, N.; KRAMPL, E.; ERNSTING, J.; NICOLAIDES, K.** 2001. Blood gases in pregnancy at sea level and at high altitude. Brit. J. Obstet. and Gynecol.108: 980-985.
- **MOORE, L.G.; BARRETT, S.; BROWN, J.B.** 1972. Progesterone concentrations in maternal and foetal blood plasma of ewes. J. Endocr. 53:187-194.
- **MOORE, LG. 2003.** Fetal growth restriction and maternal oxygen transport during high altitude pregnancy. High. Alt. Med. Biol. 4:141-156.

- **NRC.** 1985. Nutrient Requirements of Sheep. 6th Edition. National Academy Press, Washington, DC. Pp. 45.
- **PACHLA, L.A.; KISSINGER, P.T.** 1979. Analysis of ascorbic acid by liquid chromatography with amperometric detector. *Methods Enzimol.* 62: 15-24.
- **PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, M.; DIAZ, 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.; ROA, M.; URQUIETA, B.; BRUZZONE, M.E.; BEHN, C.; RAGGI, L.A.** 2004. Effect of hypobaric hypoxia on plasma progesterone and estradiol during pregnancy in ewes; comparison between high altitude adapted and non-adapted animals. *Proceeding of 15th International Congress on Animal Reproduction.* P.74. Abstract.
- **RAIJMAKERS, M.T.M.; DECHEND, R; POSTON, L.** 2004. Oxidative stress and preeclampsia. *Hypertension* 44:374-380.
- **ROA, M.** 2004. Concentraciones plasmáticas de Progesterona y Estradiol durante la preñez en ovejas criollas adaptadas y no adaptadas a la altura. Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Fac. de Cs. Veterinarias y Pecuarias. U. de Chile. 42p.
- **ROSENFELD, CH.R; COX, E.B; ROY, T; MAGNESS, R.R.** 1996. Nitric Oxide Contributes to estrogen-induced vasodilatation of the ovine uterine circulation. *J. Clin. Invest.* 2158-2166.
- **RUTTER, B.; RUSSO, A.F.** 2002. Capítulo I. In: Fundamentos de la Fisiología de la gestación y el parto de los animales domésticos. 1^a ed. Eudeba. Buenos Aires, Argentina. 245p.
- **VITZTHUM, V.J.** 2001. The home team advantage: reproduction in women indigenous to high altitude. *J. Exp. Biol.* 204:3141-3150.
- **WALSH, S.H.** 1988. Progesterone and estradiol production by normal and preeclamptic placentas. *Obstet. Gynecol.* 71:222-226.

- **ZAMUDIO, S.; LESLIE, K.K; WHITE, M.; HAGERMAN, D.; MOORE, L.G.** 1994.
Low serum estradiol and high serum progesterone concentrations characterize hypertensive pregnancies at high altitude. J .Soc. Gynecol. Invest. 1:197-205.

- **ZHAO, B.; THAU, S.Y.; LU, J.I.; LAI, M.H.; MOOCHHALA, J.M.** 2004.
Simultaneous determination of vitamins C, E and β -carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode – array detector. J. Pharm. Pharmaceut. Sei. 7: 200-204.