

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



**EFFECTO DE ANTIOXIDANTES SOBRE VARIABLES
SANGUÍNEAS Y ENDOCRINAS FETALES EN
GESTACIONES OVINAS EN LA ALTURA**

PAULINA ANDREA CAMPOS BRAVO

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

PROFESOR GUÍA: DR. VICTOR HUGO PARRAGUEZ

FINANCIADO POR PROYECTO FONDECYT N° 1020706

SANTIAGO, CHILE

2006

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	18
MATERIALES Y MÉTODO	19
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	52
BIBLIOGRAFÍA	53

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de los antioxidantes, vitamina C y E, sobre variables sanguíneas y endocrinas fetales, en ovejas que gestaron a gran altura. Se utilizaron 12 ovejas preñadas, seis originarias de la altura (grupo HH+V) y seis originarias del nivel del mar que fueron llevadas a la altura (grupo LH+V), las cuales fueron suplementadas diariamente con vitamina C (500 mg /animal/ día) y vitamina E (350 UI/ animal/ día), durante el encaste y toda la gestación desarrollada a 3600 m.s.n.m. Las ovejas y los fetos se operaron para la implantación de catéteres crónicos arteriales y venosos. Se tomaron muestras de sangre arterial y venosa tanto de madres y fetos cada tres días hasta la fecha de parto para la determinación de las variables sanguíneas: presión parcial de oxígeno (PaO_2), presión parcial de dióxido de carbono ($PaCO_2$), pH, concentración de hemoglobina (Hb), saturación de hemoglobina (Sat Hb), volumen globular aglomerado (V.G.A.) y endocrinas: cortisol, insulina, además de glicemia. Como resultado, las variables sanguíneas se igualaron entre fetos de altura y subidos, mejorando positivamente respecto de lo reportado para fetos sin administración de antioxidantes, incrementando la PaO_2 , Sat Hb, pH y disminuyendo la $PaCO_2$. A su vez, se incrementaron las concentraciones plasmáticas de insulina y glucosa fetal, sin exhibir mayores cambios en el cortisol. En el caso de las madres, las variables sanguíneas también se asemejaron entre grupos de altura y subidos. La insulina y glicemia se incrementaron y el cortisol se redujo respecto de ovejas sin administración de vitaminas. Se concluye que, las mejoras observadas en las variables sanguíneas y endocrinas fetales pueden atribuirse al efecto que tiene la suplementación con antioxidantes sobre el organismo al combatir el estrés oxidativo, lo que contribuyó a una mejora en la respuesta adaptativa a la gestación a gran altura, expresándose en un aumento del peso al nacimiento en ambos grupos.

SUMMARY

The objective of this study was to determine the effect of antioxidants, vitamin C and E, on blood and endocrine fetal variables in pregnant ewes at high altitude. Twelve pregnant ewes were used, six high altitude native ewes (HH+V group) and six low-altitude native ewes moved to high altitude (LH+V group), which were daily supplemented with vitamin C (500mg/animal/day) and vitamin E (350UI/animal/day), during mating and all gestation at 3600 m.a.s.l. The ewes and the fetuses were implanted with arterial and venous chronic polyvinyl catheters. The animals were sampled every three days until delivery, for determination of blood variables: Partial pressure of oxygen (PaO_2), Partial pressure of carbon dioxide (PaCO_2), pH, hemoglobin concentration (Hb), hemoglobin saturation with oxygen (Sat Hb), hematocrit (V.G.A.), and endocrine variables: cortisol, insulin and glycemia. Our results showed that in general, blood variables became similar between HH+V and LH+V fetuses, increasing PaO_2 , Sat Hb, pH and decreasing PaCO_2 , when compared with that reported for fetuses in absence of antioxidant administration. In addition, increased fetal plasma concentration of insulin and glucose, without bigger changes on cortisol, were also observed. In the case of mothers, the blood variables were also improved. Plasma cortisol concentration decreased in comparison with that reported for ewes in absence of administration of vitamins. In conclusion, the improvement in fetal blood and endocrine variables, can be attributed to the effect of antioxidants supplementation to avoid the oxidative stress, contributing to improve the adaptive response at high altitude during gestation.

A mis padres.....

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer profundamente a mis padres, Sara y Luis, a los que admiro por su incansable amor, apoyo, valores entregados y por enseñarme desde pequeña a querer y cuidar a los animales. A toda mi familia, especialmente a mis hermanos Jorge, Alonso, Gustavo, Claudio y Adrián, gracias por su apoyo, consejos y cariño.

Agradezco en forma especial al Dr. Víctor Hugo Parraguez, por depositar su confianza en mi al darme la oportunidad de participar en este maravilloso proyecto, por su tiempo, preocupación, consejos y por darme la posibilidad de conocer el altiplano chileno.

A mis compañeros de trabajo en la altura Miljenko Atlagich y muy especialmente a mi compañera y amiga Paz Mocarquer, por los grandes momentos vividos durante los cuatro meses de aventura en la gran altura, con frío, terremoto, pero todos dignos de recordar.

A Gabino Llusco Poma y su familia, por ayudarnos en el trabajo con los animales y muy especialmente por enseñarnos y compartir con nosotros la cultura aymará.

A la doctora Bessie Urquieta por su ayuda, tiempo, cariño y dedicación.

A mis amigas Jime, Ale, Karen y especialmente a Romi y Cata, por su afecto y los inolvidables momentos vividos en la facultad.

A Dios, por haber puesto en mi camino a tanta gente especial.

Y a todos los que de alguna manera me ayudaron y participaron en este proceso de ser veterinaria, muchas gracias.....

INTRODUCCIÓN

El ambiente en el cual se lleva a cabo la gestación es en sí un ambiente hipóxico, por ello el feto ha desarrollado mecanismos fisiológicos, como una hemoglobina con mayor afinidad por el oxígeno, facilidad en la excreción de CO₂, entre otros, que le permiten un adecuado desarrollo y crecimiento en el vientre materno.

El hecho de enfrentar una gestación en un ambiente de hipoxia hipobárica, es decir, bajo una disminuida presión atmosférica y fracción inspirada de oxígeno, lo que tiene como consecuencia una menor presión parcial de oxígeno arterial materna y fetal, pone a prueba la capacidad adaptativa para el adecuado desarrollo de la gestación. Así, la disminución en la disponibilidad de oxígeno fetal se considera como un estrés y tiene consecuencias sobre el metabolismo energético como concentración y disponibilidad de glucosa, sobre el sistema endocrino en cuanto a los niveles de hormonas claves para el desarrollo fetal como cortisol e insulina, síntesis de nuevos tejidos y crecimiento, lo que se evidencia en los bajos pesos al nacimiento y talla pequeña que es característico de los recién nacidos de gran altura y que eventualmente puedan tener consecuencias en la salud a largo plazo.

Los mecanismos por los cuales la disminución de oxígeno disponible genera estos efectos son variados y no del todo conocidos. Sin embargo, el aumento de las especies reactivas del oxígeno, que generan un estrés oxidativo, pueden estar perturbando la homeostasis metabólica y ser los causantes de una serie de alteraciones tanto a nivel materno, como en el normal desarrollo fetal y vida postnatal. Considerando lo anterior, existen una serie de estudios que apuntan a la defensa antioxidante como un mecanismo capaz de contrarrestar tales efectos.

El objetivo de este trabajo fue establecer el efecto del uso de antioxidantes (vitamina C y E) en la dieta de ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura durante la gestación, sobre variables sanguíneas y endocrinas fetales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La hipoxia hipobárica, definida como una disminución de la presión de oxígeno en el aire ambiental, producto de la menor presión atmosférica que se produce al ir ascendiendo en altura, ha sido un tema de gran interés a investigar por el mundo científico, en términos de conocer los efectos que genera y cómo el hombre logra adaptarse a tales condiciones extremas.

Se ha observado que los habitantes andinos presentan mayores concentraciones de Hb, mayor volumen pulmonar, lenta respuesta ventilatoria a la hipoxia, entre otras características, que le confieren la capacidad de adaptarse exitosamente a la hipoxia de altura. A su vez, existen diferencias en los grados de adaptación a la gran altura entre las poblaciones residentes en ella (Andinos, Tibetanos, Etiópes), situación atribuida al tiempo de adaptación a esta condición y con ello cambios genéticos, en donde las poblaciones de más antigüedad viviendo a gran altura son las más adaptadas (Beall, 2003). Similar situación ocurre en los animales, donde los camélidos sudamericanos se destacan por ser los más adaptados a las condiciones de gran altura con miles de años de adaptación y, por lo tanto, les confiere un mayor éxito en su desarrollo. Por otra parte, los ovinos, una especie introducida en la región alto andina por los españoles hace ya más de 500 años, presenta índices productivos y reproductivos bajos, a saber: baja fertilidad, bajo peso al nacimiento y proporción de recién nacidos, entre otros (De Carolis, 1987).

La exposición al ambiente de altura genera distintos grados de hipoxemia, de acuerdo a la altura sobre el nivel del mar, lo que deteriora el intercambio gaseoso materno-fetal. Con el deterioro del intercambio gaseoso, el feto es capaz de montar respuestas adaptativas que tienen impacto variable sobre el metabolismo y transporte de oxígeno, dependiendo de la severidad y duración de la hipoxia. Así, en hipoxemia crónica hay una disminución en el consumo de oxígeno y de los movimientos fetales. También ocurre una redistribución del flujo sanguíneo a órganos vitales (corazón, adrenales y cerebro), pero no es tan pronunciado como en la hipoxemia aguda (Richardson y Bocking, 1998).

La hipoxia crónica, a su vez, altera la respuesta materna a la preñez, expresándose en una disminución de la expansión del volumen sanguíneo y del incremento del gasto cardíaco comparado con el nivel del mar. El crecimiento y remodelación de la arteria uterina y otros vasos uteroplacentarios es incompleta a gran altura, lo que resulta en una menor redistribución del flujo ilíaco común hacia la arteria uterina y un flujo arterial uterino más bajo cerca del término de la gestación (Moore, 2003).

Variables sanguíneas e hipoxia

A pesar de que, en condiciones de normoxia, la PaO_2 fetal es baja, el transporte de oxígeno a los tejidos fetales resulta ser adecuado. Esto es debido, en parte, a la incrementada capacidad de transporte de oxígeno de la sangre fetal, a las más altas concentraciones de hemoglobina, la cual incrementa durante toda la gestación, y a la más alta afinidad por el oxígeno, lo cual permite la saturación de la sangre fetal a bajas presiones parciales de oxígeno. Sumado a lo anterior, ocurre una sobreperfusión de órganos fetales en comparación con sus requerimientos de oxígeno. Estas características la permiten al feto tener una concentración de oxígeno sólo levemente menor que la sangre materna (Richardson y Bocking, 1998).

Un estudio comparó variables sanguíneas en mujeres gestantes a gran altura versus a nivel del mar. Se observó que las madres de altura tuvieron valores más bajos de PaO_2 , PaCO_2 y saturación de oxígeno que las del nivel del mar y un mayor pH, hemoglobina y contenido arterial de oxígeno. Además, en las gestaciones de altura, existió una buena adaptación materna durante el primer trimestre con un aumento en la ventilación, resultando en un incremento de la PaO_2 y Sat Hb. La Hb se mantuvo estable y el CaO_2 sin cambios. Sin embargo, en el tercer trimestre, la Sat Hb y CaO_2 declinaron producto de las mayores demandas fetales en este periodo. Esto último, considerado como una descompensación materna a la preñez, no se observó en mujeres que han vivido por más tiempo en la altura (McAuliffe *et al.*, 2001). A su vez, los fetos gestados a gran altura son más hipoxémicos que los del nivel del mar, lo que se expresa en un hematocrito y niveles de hemoglobina más altos. Con el aumento de estas dos variables, mejora el transporte de oxígeno, pero se

incrementa la viscosidad sanguínea, lo que puede perjudicar la perfusión tisular a nivel capilar (Krampl, 2002).

Ovejas originarias del nivel del mar que gestaron en altura (subidas), al igual que sus fetos, presentaron tendencia a la acidemia, aunque sólo fue significativamente diferente en los fetos en el lapso de 6-20 días pre parto. Además, tanto madres como fetos presentaron mayores valores absolutos de PaCO₂, sólo significativo para las primeras en el lapso 66-80 días pre parto, junto con menores valores absolutos de PaO₂. Las ovejas subidas también presentaron mayores valores de VGA y Hb que las nativas de altura y en términos absolutos, madres y fetos de altura tuvieron mayor Sat Hb que el grupo subidas. El O₂ arterial y la extracción de oxígeno fue mayor en los fetos de altura y en ovejas subidas, dado en estas últimas por los mayores valores de VGA y Hb. Esto demuestra que la hipoxia crónica provoca cambios en las variables sanguíneas maternas y fetales como respuesta compensatoria a la baja del oxígeno ambiental. Estos cambios son mucho más marcados en las ovejas madres que en fetos y, principalmente, en ovejas no adaptadas a la altura (Fernandois, 2004).

Se ha comprobado que la hipoxia hipobárica reduce la tasa de crecimiento intrauterino en ovejas, lo que se traduce en un bajo peso al nacimiento de los corderos, siendo 26 a 29% más livianos que los corderos gestados a nivel del mar (Parraguez *et al.*, 2005). Se ha establecido, además, una menor ganancia de peso diaria desde el parto a los 120 días de edad, en comparación a los criados a nivel del mar, demostrando el claro efecto detrimental que tiene la hipoxia sobre el crecimiento, cuyos efectos estarían relacionados con el grado de aclimatación de los individuos a la altura (Parraguez *et al.*, 2004).

Investigaciones en otras especies animales entregan información similar. En ratones mantenidos bajo hipoxia en el último tercio de la preñez, se demostró que ésta induce restricción de crecimiento, ya que los pesos al nacimiento, longitud del cuerpo y diámetro fronto occipital fueron más bajos que los controles. Además, la expresión de RNAm para algunas proteínas surfactantes se mostraron significativamente reducidas en los fetos hipóxicos comparados con los normales, lo cual puede aumentar el riesgo de alteraciones pulmonares en fetos con restricción de crecimiento intrauterino (Gortner *et al.*, 2005).

La disminución del peso al nacimiento con la altura es generalmente atribuida a la hipoxia hipoxémica, ya que éste depende de la disponibilidad de oxígeno y glucosa. Se encontró que fetos de ovejas bien oxigenados ($\text{PaO}_2 > 18$ torr) tienen mayores glicemias que fetos bajo hipoxemia crónica ($\text{PaO}_2 < 18$ torr) y que los fetos hipoxémicos tienen un mayor consumo de oxígeno por kg de peso corporal (Charlton y Creasy, 1977). Esto coincide con lo propuesto por Moore (2003), quien indica que la disminución del flujo sanguíneo uteroplacentario producto de una incompleta adaptación, aparenta hacer la mayor contribución a la reducción de peso al nacimiento a gran altura. Bajo condiciones de normoxia existe una fuerte correlación entre la glicemia materna y fetal, siendo la glicemia fetal cercana a un tercio de la materna. Sin embargo, los fetos hipoxémicos tienden a tener glicemias más bajas y no alteran su captación de glucosa en respuesta a cambios en las concentraciones de glucosa materna (Charlton y Creasy, 1977).

Variables endocrinas e hipoxia

La insulina es producida por el páncreas fetal desde etapas tempranas del desarrollo. Las concentraciones *in útero* incrementan a principios y mediana gestación y permanecen estables hasta el término de ésta. Se relaciona positivamente con la glicemia fetal y el peso corporal al nacimiento. La insulina mejora la acreción de tejidos vía efecto anabólico sobre el metabolismo fetal y por estimulación de la producción de IGF-I (factor de crecimiento tipo insulina), siendo entonces, una hormona promotora del crecimiento (Fowden y Forhead, 2004).

La insulina es descrita como una hormona clave en la regulación del crecimiento fetal tardío, ya que se ha demostrado que al destruir la células β del páncreas y, por lo tanto, suprimir la secreción de insulina en la gestación tardía, se produce una disminución en el peso corporal fetal y peso de órganos como hígado, corazón y riñón, además de una baja en el depósito de proteínas en la carcasa (Philipps *et al.*, 1991). Asimismo, una deficiencia provoca restricción de crecimiento intrauterino de tipo simétrico (Fowden y Forhead, 2004).

Se ha descrito que los fetos ovinos montan una fuerte respuesta de insulina a la hiperglicemia, con un mínimo cambio en la razón insulina/glucosa, indicando una estrecha relación entre la secreción de insulina y glucosa plasmática (Jackson *et al.*, 2000).

Se ha observado que mujeres gestantes a gran altura poseen menores concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina y una alta sensibilidad a la insulina, con similar función de las células β , comparado con las gestantes a nivel del mar. La insulina permanece baja y no incrementa durante la gestación, explicado por una alta sensibilidad a la insulina más que por una función deteriorada de células β , y también debido a un incremento de la extracción hepática o placentaria de insulina. Así, las bajas glicemias, sumadas a una elevada sensibilidad periférica a la insulina, podrían ayudar a explicar los bajos pesos al nacimiento en gestaciones de mujeres en la altura (Krampl *et al.*, 2001).

Asimismo, fetos bajo un estrés hipóxico agudo (horas), ponen en marcha mecanismos α - adrenérgicos los que producen una marcada, pero incompleta inhibición de la secreción de insulina relacionada a las concentraciones periféricas de glucosa. Cuando la actividad inhibitoria α -adrenérgica es bloqueada, se manifiesta un potente efecto estimulador β -adrenérgico para la síntesis de insulina. Sin embargo, un estrés hipóxico o hipoxia moderadamente severa puede tener un efecto residual en suprimir la estimulación β -adrenérgica para la secreción de insulina. A diferencia de lo observado en los fetos, en el animal adulto la acción α -adrenérgica inhibe la secreción de insulina independiente de la glicemia y además, la epinefrina y norepinefrina inhiben completamente la respuesta secretoria de insulina a todos los estímulos fisiológicos (Jackson *et al.*, 2000).

En el caso de fetos con restricción de crecimiento intrauterino por insuficiencia placentaria, que podría considerarse un estrés crónico, situación similar a una gestación a gran altura, se ha observado un déficit en la secreción de insulina, y en los casos severos, reducción del tejido endocrino pancreático y disfunción de las células β (Hay, 2006).

La hipoxia por sí sola puede alterar el metabolismo de nutrientes en gestaciones de altura. Esto respaldado por el hecho de que la hipoxia puede alterar la densidad y funcionalidad de los transportadores de nutrientes a nivel de la placenta, ya que la expresión del transportador de glucosa placentario, GLUT1, y el sistema proteico transportador de aminoácidos, están reducidos en la altura (Zamudio, 2003).

Durante la mayor parte de la gestación, la concentración fetal de glucocorticoides permanece baja y deriva de la madre a través de una gradiente de concentración materno-fetal, que varía según la especie. En la oveja, esta gradiente es pequeña y es mantenida por la enzima placentaria 11 β HSD2, que convierte cortisol y cortisona en metabolitos inactivos. El 90% del cortisol en la circulación fetal es de origen materno, antes de que la adrenal fetal comience su producción cerca del parto (Fowden y Forhead, 2004).

En la mayoría de los mamíferos, el cortisol fetal se eleva cerca del final de la gestación, dado el incremento en la producción de la glándula adrenal fetal y a una disminución en la tasa de conversión de cortisol a cortisona. El cortisol es un regulador fisiológico del crecimiento fetal durante la gestación tardía, ya que mantiene las concentraciones circulantes de glucosa en útero en el periodo inmediatamente previo al nacimiento por la activación de la glucogénesis y juega un rol principal en la maduración de tejidos fetales que lo preparan para la vida extrauterina (Fisher, 1998).

La hipoxia crónica parece alterar la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, ya que la administración exógena de hormona adrenocorticotrófica (ACTH) a fetos ovinos hipóxicos en el día 136 de gestación, no incrementa notoriamente los niveles de cortisol comparados con los fetos normóxicos (Harvey *et al.*, 1993). En fetos ovinos bajo hipoxia crónica en la gestación tardía, se ha reportado una disminución en la biosíntesis de RNAm adrenal para 17 α -hidroxilasa (enzima requerida para la cadena de síntesis de cortisol) y el receptor de ACTH, lo que muestra una reducción en la capacidad de síntesis de cortisol y en la respuesta a ACTH. Esto sería una respuesta adaptativa para evitar una excesiva producción de este esteroide que puede traer como consecuencia restricción de crecimiento e incluso un parto prematuro (Myers *et al.*, 2005).

Concentraciones de cortisol materno incrementadas durante la preñez son necesarios para el normal incremento del flujo sanguíneo uterino. Sin embargo, variaciones en los niveles de cortisol materno, deterioran el adecuado desarrollo del feto, donde elevados niveles alteran el crecimiento fetal, a través de cambios hormonales fetales o por cambios en la estructura placental o en la función de factores de crecimiento. Asimismo, reducciones de esta hormona podrían disminuir el crecimiento fetal por reducción de la perfusión placentaria (Jensen *et al.*, 2004).

Por otra parte, ovejas y fetos originarios de altura (3600 m.s.n.m.) demostraron no tener diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones plasmáticas de cortisol, insulina y en glicemia, comparado con sus pares del nivel del mar que gestaron en la altura, en mediciones realizadas durante la última mitad de la gestación (Parraguez*, datos no publicados).

Hipoxia, especies reactivas del oxígeno (ROS) y estrés oxidativo

ROS son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados, los cuales entregan o quitan electrones a otras moléculas para generar compuestos más estables. Son producidos en células de variados tejidos en condiciones normales, ya que un 1 a 3% del oxígeno consumido por el organismo se desvía a la formación de ROS (Fang *et al.*, 2002). Sin embargo, una excesiva producción puede dañar lípidos, carbohidratos, proteínas y el ADN, desencadenando el llamado estrés oxidativo (Gitto *et al.*, 2002).

El estrés oxidativo, es definido como un desbalance entre los agentes pro-oxidantes y la defensa antioxidante, que potencialmente puede provocar un daño celular (Gitto *et al.*, 2002). En humanos expuestos a ambientes de alta montaña, la producción de ROS se ve incrementada, debido a la hipoxia tisular generada producto de la hipoxia hipobárica que reduce el contenido de oxígeno arterial. Esto se refleja en el aumento de indicadores de estrés oxidativo presentes en la respiración, sangre, orina y tejidos. Contribuyen a la formación de ROS y estrés oxidativo de altura el ejercicio físico intenso, la radiación ultravioleta, auto

* Parraguez, V.H., Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

oxidación de catecolaminas, transformación de hipoxantina por xantina oxidasa y una dieta baja en antioxidantes (Askew, 2002).

El estrés oxidativo es una situación presente durante el embarazo y que se incrementa debido a las mayores demandas metabólicas y requerimientos de oxígeno tisular que ocurren durante la gestación, lo que aumenta la tasa de producción de ROS con el consecuente estrés oxidativo (Gitto *et al.*, 2002). Se ha propuesto al estrés oxidativo como uno de los factores causantes de la disminución del peso al nacimiento (Kim *et al.*, 2005), ya que los niveles de biomarcadores de estrés oxidativo como 8-hydroxydeoxyguanosina (8-OH-DG) y malondialdehído (MDA) fueron elevados en la orina de mujeres embarazadas, lo que fue asociado con la reducción de peso al nacimiento en partos a término.

Es reconocido que la condición de estrés oxidativo es capaz de producir diversas alteraciones repercutiendo desde la fertilidad, y en la gestación desde etapas tan tempranas como la fecundación, estado embrionario y durante el curso del embarazo, generando complicaciones como preclampsia, aborto, ruptura prematura de membranas, partos prematuros, entre otros. De ahí la importancia de manejar su presentación, lo que ha motivado la búsqueda de tratamientos que permitan prevenir sus efectos nocivos, y desde esta perspectiva, se ha puesto atención a la acción de la defensa antioxidante del organismo y a la suplementación con agentes antioxidantes (Gutierrez, 2005).

Antioxidantes y suplementación

La defensa antioxidante del organismo se puede dividir en antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. En los primeros se encuentran las enzimas glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, catalasa y superóxido dismutasa. Entre los no enzimáticos destacan glutatión, selenio, zinc, arginina, citrulina, taurina, creatina, polifenoles, vitaminas A, C y E (Fang *et al.*, 2002). Los antioxidantes pueden en parte, controlar los efectos deletéreos de los ROS y el consecuente estrés oxidativo, ya que pueden eliminar los agentes pro-oxidantes y remover los radicales libres.

La vitamina E abarca a un grupo de ocho isómeros moleculares que están caracterizados por poseer un anillo de cromo y una cadena. El término vitamina E es utilizado como una descripción genérica de todos los derivados de los tocol y tocotrienoles que exhiben cualitativamente la actividad biológica de un α -tocoferol. Los tocoferoles describen cuatro formas α , β , γ y δ que difieren sólo en el número y orden de los grupos metil alrededor del anillo de benceno en la estructura de cromo. Los llamados tocotrienoles, son moléculas que poseen tres dobles enlaces en su cadena (Wang y Quinn, 1999).

La vitamina E está presente en las membranas celulares y es transportada en el organismo como componente de las proteínas plasmáticas, siendo las lipoproteínas de baja densidad las que transportan la mayor parte de esta vitamina, formando parte de la monocapa lipídica de esta estructura. La vitamina E es el removedor de radicales lipoperóxidos en membranas biológicas más abundante y eficiente. Previene del daño celular provocado por los radicales libres a los tejidos y específicamente a los lípidos insaturados (Sies *et al.*, 1992). La lipoperoxidación generada puede alterar la fluidez de membranas, lo que ocasiona que los glóbulos rojos pierdan flexibilidad y por lo tanto, la entrega de oxígeno a los tejidos se perjudica. Sin embargo, la vitamina E al formar parte de la membrana, podría contrarrestar este efecto. Además de proteger contra la lipoperoxidación de membranas biológicas, la vitamina E ayudaría a reparar aminoácidos oxidados de las proteínas integrales de membrana. (Simon-Schnass, 1996).

La oxidación de lípidos por radicales libres genera una cadena de propagación, debido a la extracción de un átomo de hidrógeno desde el lípido por el radical peróxido, generando un radical lipoperóxido el cual puede seguir oxidando otros lípidos. El rol principal del α -tocoferol es remover estos radicales lipoperóxidos antes de que estos puedan atacar otros sustratos lipídicos. Lo anterior se logra porque la vitamina E puede ceder electrones a los lipoperóxidos y de esta forma estabiliza y frena la reacción en cadena. Posteriormente, el radical tocoferoxilo debe ser regenerado a tocoferol (Wang y Quinn, 1999), situación mediada por la vitaminas C, que puede reducir directa o indirectamente estos radicales y, entonces, ayudar a restituir la actividad de la vitamina E (Sies *et al.*, 1992) lo que mejora la eficiencia de su rol como antioxidante lipídico.

La vitamina C o ácido ascórbico, es el antioxidante más importante en fluidos extracelulares, presente en compartimientos acuosos como citosol, plasma y otros fluidos corporales (Sies *et al.*, 1992). Es capaz de atrapar la mayoría de los radicales presentes y actuar como mecanismo defensivo de primera línea contra los ROS. Luego de su colaboración con la vitamina E, la vitamina C se transforma en un radical el cual no es una especie reactiva, porque su electrón no pareado es energéticamente estable. Posteriormente, el radical es reconvertido a vitamina C por glutatión, reestableciéndose el equilibrio.

La vitamina C participa de las reacciones de hidroxilación de las vías de síntesis del cortisol y se ha visto que incrementa la síntesis *in vitro* de este esteroide en células adrenocorticales estimuladas con ACTH. También es necesaria en la formación de hueso, ya que participa como cofactor en los pasos de hidroxilación de la síntesis del colágeno (Goralczyk *et al.*, 1992).

La suplementación con antioxidantes lipo e hidrosolubles en montañistas durante el ascenso a gran altura demostró tener efectos benéficos, ya que disminuyó la incidencia y severidad de la presentación del mal agudo de montaña (AMS) y mejoró la saturación de oxígeno arterial en reposo comparado con el grupo placebo, demostrando el rol de los radicales libres en la fisiopatología del AMS (Bailey y Davies, 2001).

Resultados similares se obtuvieron al suplementar con vitamina E a montañistas, donde en individuos controles los niveles de pentano exhalado (medida de lipoperoxidación) fueron casi 100% más altos que en los suplementados, sugiriendo que los controles entran en riesgo metabólico de daño celular y que puede ser evitado por la suplementación con antioxidantes. Además, es conocido que una prolongada permanencia en altura disminuye el desempeño físico, lo que se refleja en la disminución del umbral anaeróbico. Sin embargo, en los individuos suplementados se elevó el umbral anaeróbico, siendo beneficioso para el desempeño y protección celular (Simon-Schnass, 1996).

Un estudio realizado en mujeres con riesgo de parto prematuro, demostró que la suplementación oral con vitaminas antioxidantes (β -caroteno, vitamina C y E) entre la 30 y 36 semana de gestación, logró reducir significativamente los niveles de MDA y, por lo tanto, de estrés oxidativo, a la vez de mejorar el estatus antioxidante de las madres, y posiblemente de los recién nacidos al momento del parto (Bolisetty *et al.*, 2002).

Existe evidencia que muestra una correlación positiva entre las concentraciones séricas maternas de vitamina C y E en mujeres durante el segundo trimestre de embarazo, con el peso y tamaño de los recién nacidos. Esto sugiere que una suplementación con vitamina C y E podría ser benéfica para el crecimiento y desarrollo fetal (Lee *et al.*, 2004). Lo anterior es relevante si se toma en cuenta que las vitaminas lipo e hidrosolubles cruzan la barrera placentaria, y que éstas últimas lo hacen con mayor facilidad (Hafez, 1998). Adicionalmente, Capper *et al.* (2005), observaron que la suplementación con vitamina E (500 mg/kg) a ovejas entre seis semanas pre parto hasta las cuatro semanas post parto, genera corderos más pesados al nacimiento, con un consecuente aumento de las concentraciones de vitamina E en tejidos como cerebro y músculo semimembranoso, sugiriendo un adecuado y efectivo traspaso de vitamina E a través de la placenta hacia el feto.

HIPÓTESIS

- Si las variables endocrinas y sanguíneas de fetos de ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura son alteradas por la exposición a la hipoxia hipobárica crónica, entonces el uso de antioxidantes podría aminorar los efectos negativos de ésta y mejorar la respuesta adaptativa a gran altura.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Establecer el efecto del uso de antioxidantes (vitamina C y E) en la dieta durante la gestación de ovejas adaptadas y no adaptadas a la hipoxia hipobárica sobre variables sanguíneas y endocrinas fetales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar variables sanguíneas como PaO₂, PaCO₂, pH, V.G.A., Hb y Sat Hb durante el último mes de gestación en ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura que consumieron antioxidantes durante la gestación, y en sus respectivos fetos.
- Conocer las concentraciones plasmáticas de insulina y cortisol, y la glicemia durante el último mes de gestación en fetos de ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura que consumieron antioxidantes durante la gestación.
- Comparar los resultados con las variables sanguíneas y endocrinas obtenidas de animales sin administración de antioxidantes, mantenidos bajo el mismo manejo y condiciones ambientales.

MATERIALES Y MÉTODO

Este estudio se realizó en el Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS) de la Universidad de Chile ubicado en Putre, I región de Tarapacá, a 3600 m.s.n.m.

Se utilizaron 12 ovejas criollas preñadas, con edad gestacional conocida. Seis de éstas correspondieron a ovejas originarias de Putre (Grupo altura ó HH+V) y las otras seis al Valle de Lluta (nivel del mar) las que fueron llevadas a la altura para su posterior encaste y gestación (Grupo subidos ó LH+V).

Mantenimiento de los animales

Durante el periodo de encaste (30 días) y la gestación, las hembras permanecieron en corrales separados de acuerdo a su origen. Ambos grupos recibieron diariamente 2 kg de heno alfalfa por animal, cantidad de alimento calculado para ovejas en el último tercio de la gestación (NRC, 1985) y agua *ad libitum*. Las ovejas fueron suplementadas con vitamina C (500 mg/animal/día) y vitamina E (350 UI/animal/día) que se administró junto al forraje.

Cirugía fetal

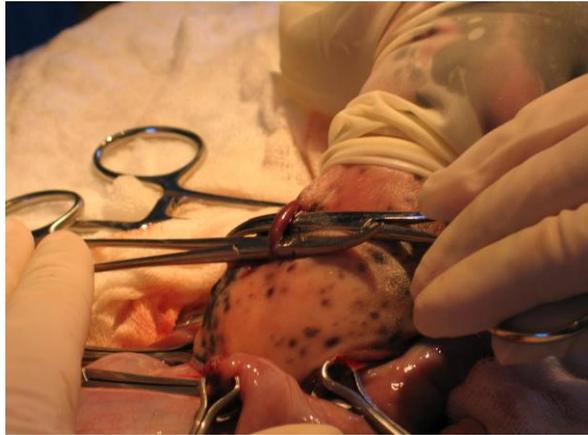
A los 120 días de gestación, aproximadamente, se realizó la cirugía con el fin de instalar catéteres (Tygon® O.D.=1.78 ; I.D.=1.50) arteriales y venosos a los fetos (Foto 1). Ésta se realizó bajo anestesia general materna con Ketamina (20 mg/kg en bolo inicial y 0,02 mg/kg/hora para mantención), con una medicación previa de Atropina (0,04mg/kg). El abordaje quirúrgico fue por medio de una incisión abdominal mediana infra-umbilical, donde luego de una histerotomía se expuso la cabeza y cuello del feto para la instalación de los catéteres en la arteria carótida y otro en la vena yugular del mismo lado (Foto 1, 2 y 3). Además se dejó un catéter en la cavidad amniótica para la administración de antibióticos (Oxitetraciclina 200 mg, 1ml/10kg) al líquido amniótico.

FOTO 1



Exteriorización de cabeza del feto para instalación de catéteres.

FOTO 2



Exteriorización de vasos fetales.

FOTO 3



Instalación y fijación de catéteres fetales arterial y venoso.

Una vez que fueron fijados los catéteres al cuello del feto, se suturó el útero y los catéteres se exteriorizaron a través del flanco izquierdo materno, donde se almacenaron en un bolsillo de lona suturado a la piel de la madre (Foto 4).

Adicionalmente, las ovejas también fueron implantadas con catéteres (Tygon® O.D.=2.29; I.D.=2.0) en la arteria y vena femoral para la determinación de gases (PaO_2 y PaCO_2), VGA, Hb, Sat Hb, pH y hormonas. Los catéteres se exteriorizaron pasando a través del tejido subcutáneo del flanco izquierdo, almacenándose en el bolsillo de lona, junto a los de los fetos.

FOTO 4



Ovejas con bolsillos de lona almacenando los catéteres maternos y fetales.

Con el fin de evitar la coagulación de sangre dentro de los catéteres, éstos se mantuvieron con una solución de heparina (1000 UI/ml) posterior a cada muestreo.

Como medicación post operatoria, a las ovejas se les administró una dosis de Penicilina G Benzatina 1.200.000 UI, Penicilina G sódica 1.000.000 UI/5ml y Metamizol sódico 40 mg/kg, todas vía intramuscular.

Toma de muestras y medición de variables

Luego de un periodo de recuperación de aproximadamente 6 días, se comenzaron los muestreos maternos y fetales de 3 ml de sangre venosa para determinación de hormonas, 1 ml para variables sanguíneas arteriales y 1 ml para variables sanguíneas venosas, cada tres días hasta la fecha de parto (Foto 5). Simultáneamente, se efectuó la medición de glicemia fetal y materna a través de un sensor de glicemia portátil modelo GlucoMen PC Meter (A. Menarini Diagnostics Ltd., UK), mediante la metodología electroquímica basada en la reacción de la glucosa-oxidasa que cataliza la oxidación de la gluconolactona, lo que genera una corriente eléctrica que se transfiere desde la sangre a los electrodos. Con esto, la magnitud de la corriente resultante es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra.

FOTO 5



Carro metálico donde fueron muestreadas las ovejas.

Los gases sanguíneos se midieron a través de un analizador de gases sanguíneos y co-oxímetro (Instrumentation Laboratory modelo IL Síntesis 25 Lexington, Ma., U.S.A) calibrado a la presión barométrica local (480 mmHg) y temperatura corporal de la oveja (38,5°C), (Foto 6).

FOTO 6



Analizador de gases sanguíneos y co-oxímetro.

Las muestras de sangre extraídas para la determinación hormonal se centrifugaron a 1.200 g x 3 min para obtener el plasma, el que fue almacenado a -20°C . Posteriormente, los plasmas fueron trasladados al Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile en Santiago, para la medición de cortisol e insulina fetal. Adicionalmente, se midieron en las madres las concentraciones plasmáticas de cortisol e insulina, y la glicemia. De esta forma se pudo tener una visión global y complementar la situación que ocurrió con estas variables en los fetos bajo estudio.

La medición de las concentraciones plasmáticas de cortisol se efectuó utilizando el kit Coat-a-Count® Cortisol y para la medición de las concentraciones plasmáticas de insulina se utilizó el kit Coat-a-Count® Insulina, ambos de DPC (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA), mediante la técnica de radioinmunoanálisis (RIA). Se utilizaron alícuotas de 25 uL de plasma para cortisol y 200 uL de plasma para insulina. La técnica está basada en una reacción antígeno-anticuerpo que genera complejos Ag-Ac, que se cuantifica cuando alcanza el equilibrio. La hormona (Ag) presente en la muestra compite con la hormona correspondiente marcada radiactivamente con I^{125} por los sitios de unión al anticuerpo, que se encuentra adherido a los tubos. Luego de la decantación del sobrenadante, los tubos fueron leídos en un Contador Gamma modelo Nuclear Enterprises NE 1612 turbo, que entrega un número de cuentas que, mediante una curva de calibración, permitió obtener las concentraciones de cortisol o insulina presentes en las muestras.

Además, se tomaron muestras de sangre de la vena yugular a los recién nacidos y a las madres el día del parto, las cuales se centrifugaron a 1.200 g x 3 min y se congelaron en un termo con nitrógeno líquido a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posteriormente medir las concentraciones plasmáticas de vitamina C y E en las madres y recién nacidos, mediante las técnicas de cromatografía líquida de alta precisión (HPLC) y detección electroquímica para detección de vitamina C, y HPLC y fluorescencia para vitamina E, siguiendo las técnicas de Pachla y Kissinger (1979) y Zhao *et al.* (2004).

Análisis de los resultados

Los resultados obtenidos para cada variable, tanto maternos como fetales, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) no paramétrico Kruskal-Wallis, y la prueba de comparaciones múltiples de Dunn`s. Se utilizó este análisis debido al bajo tamaño de muestras, distribución no normal de los datos y/o por varianzas no homogéneas. Además, para las variables endocrinas se obtuvieron regresiones (no lineal para cortisol y lineal para insulina y glicemia) en función del tiempo de gestación.

Adicionalmente, para cada variable estudiada, se calcularon promedios en base a rangos de días previos al parto: 21-35, 6-20 y 1-5, obteniendo así mayor información de la dinámica en el tiempo de cada variable en cuestión.

Los resultados fueron expresados como promedio más desviación estándar y las diferencias se consideraron significativas cuando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

La duración de la gestación fue de igual magnitud entre los grupos, donde el grupo altura promedió $150 \pm 3,6$ días y los subidos $150 \pm 1,8$ días. Los pesos de los corderos al nacimiento fueron en promedio $4,08 \pm 0,82$ kg y $4,07 \pm 0,31$ kg para el grupo de altura y subidos, respectivamente ($p > 0,05$).

Las concentraciones plasmáticas de vitamina C obtenidas en las madres fueron de $4,2 \pm 0,9$ y $4,3 \pm 0,6$ $\mu\text{g/mL}$ para ovejas de la altura y subidas, respectivamente ($p > 0,05$). Para el caso de la vitamina E, las concentraciones plasmáticas fueron de $1,8 \pm 0,2$ para las ovejas de altura y $1,5 \pm 0,3$ $\mu\text{g/mL}$ para las subidas ($p > 0,05$). En los recién nacidos las concentraciones plasmáticas de vitamina E fueron de $4,90 \pm 0,04$ y $4,47 \pm 0,12$ $\mu\text{g/mL}$ para los mismos grupos ($p > 0,05$). Las concentraciones de vitamina C no se midieron en los corderos, debido a problemas en la conservación de las muestras.

I VARIABLES SANGUÍNEAS NO ENDOCRINAS

La tabla 1 muestra los valores para las variables sanguíneas fetales, donde ambos grupos presentaron valores similares, con excepción de la PaO₂ que fue mayor en el grupo originario de la altura y la PaCO₂ que fue mayor en el grupo de animales subidos.

TABLA 1

VARIABLES SANGUÍNEAS FETALES PROMEDIO PARA EL ÚLTIMO MES DE GESTACIÓN EN OVEJAS SUPLEMENTADAS CON VITAMINAS C Y E, MANTENIDAS A 3600 m.s.n.m.

VARIABLE	GRUPO	
	Fetos Altura	Fetos Subidos
PaO ₂ (mmHg)	18,73 ± 1,59 ^a	17,00 ± 1,28 ^b
PaCO ₂ (mmHg)	36,54 ± 1,91 ^a	38,77 ± 1,98 ^b
pH	7,431 ± 0,01	7,420 ± 0,013
V.G.A. (%)	33,23 ± 4,48	33,66 ± 2,6
Hb (mg/dL)	11,34 ± 1,65	11,40 ± 1,07
Sat Hb (%)	64,56 ± 7,69	58,23 ± 5,90

-Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos (p<0,05).

Las variables sanguíneas fetales detalladas por rango de días antes del parto (Tabla 2), no demostraron diferencias significativas entre sí a medida que avanzó la gestación, a pesar de que en promedio, la PaCO₂ fue levemente más alta en los fetos subidos. En el grupo de fetos subidos, hubo complicaciones con el funcionamiento de los catéteres en los últimos 5 días de la gestación, por lo que no se muestran datos para el rango 1-5 días pre parto.

TABLA 2

VARIABLES SANGUÍNEAS FETALES DURANTE EL ÚLTIMO MES DE GESTACIÓN EN OVEJAS SUPLEMENTADAS CON VITAMINAS C Y E, MANTENIDAS A 3600 m.s.n.m.

VARIABLE	GRUPO	RANGO DE DIAS PREVIOS AL PARTO		
		21-35	6-20	1-5
PaO₂ (mmHg)	Altura	18,77 ± 1,48	18,85 ± 1,34	18,25 ± 2,87
	Subidos	17,00 ± 1,12	17,22 ± 1,48	-----
PaCO₂ (mmHg)	Altura	37,50 ± 1,27	35,62 ± 2,04	36,48 ± 2,12
	Subidos	38,70 ± 2,03	38,84 ± 2,05	-----
pH	Altura	7,429 ± 0,015	7,433 ± 0,01	7,430 ± 0,03
	Subidos	7,422 ± 0,015	7,419 ± 0,01	-----
V.G.A. (%)	Altura	31,62 ± 3,36	32,85 ± 4,10	39,75 ± 3,69
	Subidos	33,89 ± 3,10	33,44 ± 2,30	-----
Hb (gr/dL)	Altura	10,48 ± 1,11	11,16 ± 1,38	13,22 ± 1,67
	Subidos	11,33 ± 1,32	11,47 ± 0,83	-----
Sat Hb (%)	Altura	66,15 ± 7,53	66,84 ± 5,14	56,60 ± 8,78
	Subidos	59,72 ± 5,33	56,74 ± 6,38	-----

En general, los valores de estas variables se mantuvieron dentro de rangos más bien estrechos y estables durante el transcurso de la gestación en los fetos de ambos grupos, presentando sólo una tendencia a mayores valores en la Sat Hb en los fetos de altura.

En las ovejas, los valores de las variables sanguíneas para el grupo de altura y subidas fueron muy semejantes entre sí, lo que se expresa en la ausencia de diferencias estadísticamente significativas. Los resultados se resumen en la tabla 3.

TABLA 3

VARIABLES SANGUÍNEAS MATERNAS PROMEDIO PARA EL ÚLTIMO MES DE GESTACIÓN EN OVEJAS SUPLEMENTADAS CON VITAMINAS C Y E, MANTENIDAS A 3600 m.s.n.m.

VARIABLE	GRUPO	
	Ovejas Altura	Ovejas Subidas
PaO₂ (mmHg)	56,66 ± 4,99	57,53 ± 3,30
PaCO₂ (mmHg)	25,54 ± 2,58	25,85 ± 2,68
pH	7,506 ± 0,02	7,477 ± 0,10
V.G.A. (%)	33,37 ± 1,73	33,07 ± 2,03
Hb (mg/dL)	12,36 ± 0,58	12,34 ± 1,09
Sat Hb (%)	84,79 ± 4,73	85,77 ± 2,61

En la tabla 4 se pueden apreciar las variables sanguíneas maternas desglosadas por rangos de días previos al parto, observándose nuevamente la misma tendencia de similitud entre los grupos de altura y subidos, sin diferencias significativas.

TABLA 4

Variables sanguíneas maternas durante el último mes de gestación en ovejas suplementadas con vitaminas C y E, mantenidas a 3600 m.s.n.m.

VARIABLE	GRUPO	RANGO DE DIAS PREVIOS AL PARTO		
		21-35	6 a 20	1 a 5
PaO₂ (mmHg)	Altura	55,38 ± 6,32	57,75 ± 4,05	56,29 ± 5,15
	Subidos	57,30 ± 2,59	58,08 ± 4,11	56,40 ± 1,52
PaCO₂ (mmHg)	Altura	25,75 ± 3,04	26,28 ± 2,51	25,46 ± 1,93
	Subidos	25,19 ± 1,42	26,62 ± 3,38	24,90 ± 1,75
pH	Altura	7,511 ± 0,018	7,505 ± 0,025	7,501 ± 0,034
	Subidos	7,509 ± 0,021	7,468 ± 0,066	7,424 ± 0,207
V.G.A.(%)	Altura	32,75 ± 1,90	33,66 ± 1,55	33,57 ± 1,90
	Subidos	33,25 ± 1,28	32,84 ± 2,67	34,40 ± 1,14
Hb (gr/dl)	Altura	12,08 ± 0,62	12,39 ± 0,49	12,62 ± 0,63
	Subidos	12,15 ± 0,53	12,29 ± 1,32	12,80 ± 1,51
Sat Hb (%)	Altura	83,81 ± 6,57	86,25 ± 2,11	83,46 ± 5,59
	Subidos	86,06 ± 2,09	85,66 ± 3,24	85,62 ± 1,82

En la tabla 5 se presentan los valores de contenido arterial de oxígeno (CaO_2), contenido venoso de oxígeno (CvO_2) y diferencial arterio-venoso (CaO_2-CvO_2) en fetos de altura y subidos, cuyas madres consumieron antioxidantes durante la gestación.

TABLA 5

Diferencial arterio-venoso fetal en el último mes de gestación en ovejas suplementadas con vitaminas C y E, mantenidas a 3600 m.s.n.m.

GRUPO	CaO₂ (ml/100mL)	CvO₂ (ml/100mL)	CaO₂-CvO₂
Fetos HH+V	10,13	7,18	2,94
Fetos LH+V	9,27	7,59	1,68

En el caso de los fetos, el grupo de altura presentó un valor superior para el CaO_2 y ambos grupos tuvieron semejantes CvO_2 , lo que se expresó en un mayor diferencial para el grupo de altura, que se corresponde con una mayor extracción de oxígeno como lo muestra la tabla 6.

TABLA 6

Extracción de oxígeno arterial fetal en el último mes de gestación en ovejas suplementadas con vitaminas C y E, mantenidas a 3600 m.s.n.m.

GRUPO	EXTRACCIÓN O₂ (%)
Fetos HH+V	29,08
Fetos LH+V	18,12

El CaO_2 , CvO_2 y $\text{CaO}_2\text{-CvO}_2$ para las ovejas se presentan en la tabla 7.

TABLA 7

Diferencial arterio-venoso durante el último mes de gestación en ovejas suplementadas con vitaminas C y E, mantenidas a 3600 m.s.n.m.

GRUPO	CaO_2 (ml/100mL)	CvO_2 (ml/100mL)	$\text{CaO}_2\text{-CvO}_2$
Ovejas HH+V	14,58	10,98	3,61
Ovejas LH+V	14,72	9,95	4,77

Como se aprecia en la tabla 7, las ovejas de altura y subidas presentan similares valores de CaO_2 y que el CvO_2 es levemente superior en las ovejas de altura. Sin embargo, las ovejas subidas presentaron un mayor diferencial arterio-venoso y una mayor extracción de oxígeno, como se puede observar en la tabla 8.

TABLA 8

Extracción de oxígeno durante el último mes de gestación en ovejas suplementadas con vitaminas C y E, mantenidas a 3600 m.s.n.m.

GRUPO	EXTRACCIÓN O_2 (%)
Ovejas HH+V	24,75
Ovejas LH+V	32,43

II VARIABLES ENDOCRINAS

1) CORTISOL

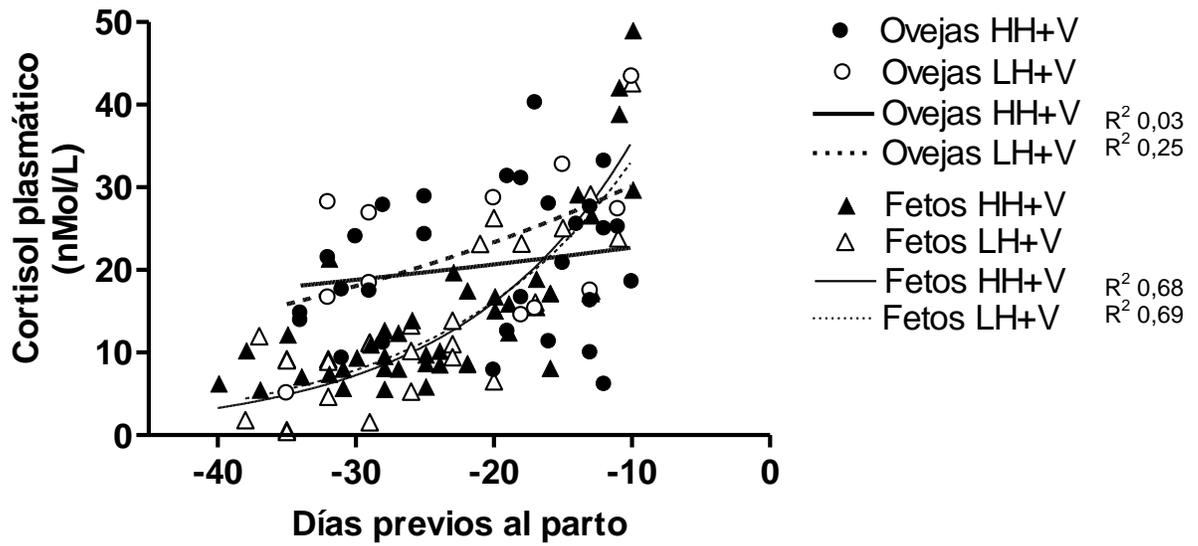
Las concentraciones plasmáticas de cortisol fetal fueron en promedio $15,03 \pm 9,98$ para los fetos HH+V y de $14,98 \pm 12,85$ nMol/L para los fetos LH+V hasta el día 10 pre parto, sin diferencia significativa. En los rangos 21-35 y 6-20 días pre parto, los fetos HH+V presentaron una tendencia a mayores concentraciones ($10,34 \pm 4,47$ y $39,33 \pm 38,63$ nMol/L, respectivamente) que los fetos LH+V ($9,15 \pm 5,46$ y $26,69 \pm 14,65$ nMol/L, respectivamente). Adicionalmente, las concentraciones de cortisol presentaron un crecimiento exponencial hacia el final del periodo en los fetos de ambos grupos.

El promedio materno para el cortisol plasmático durante el periodo de estudio fue de $33,57 \pm 26,86$ para las ovejas HH+V y de $43,81 \pm 34,93$ nMol/L para las ovejas LH+V. Éstas no presentaron diferencias significativas entre grupos. Al analizar los datos por rangos de días previos al parto, ambos grupos exhibieron una tendencia similar, donde el cortisol se mantuvo estable, con un aumento en los últimos 5 días de la gestación, siendo más marcado en las ovejas LH+V que en las HH+V ($69,42 \pm 50,68$ y $38,17 \pm 28,34$ nMol/L, respectivamente).

En el gráfico 1 se presentan los valores experimentados de cortisol plasmático para fetos y ovejas de ambos grupos y las funciones de regresión de esta variable en función de los días pre parto. Se observa que las ovejas LH+V presentan una tendencia a mayor concentración plasmática de cortisol que las HH+V. En el caso de los fetos, no se presentan diferencias en la tendencia de esta variable en función del tiempo.

GRÁFICO 1

Concentración plasmática de cortisol materno y fetal en gestaciones de ovejas suplementadas con vitamina C y E, mantenidas a 3600 m.s.n.m.



2) INSULINA

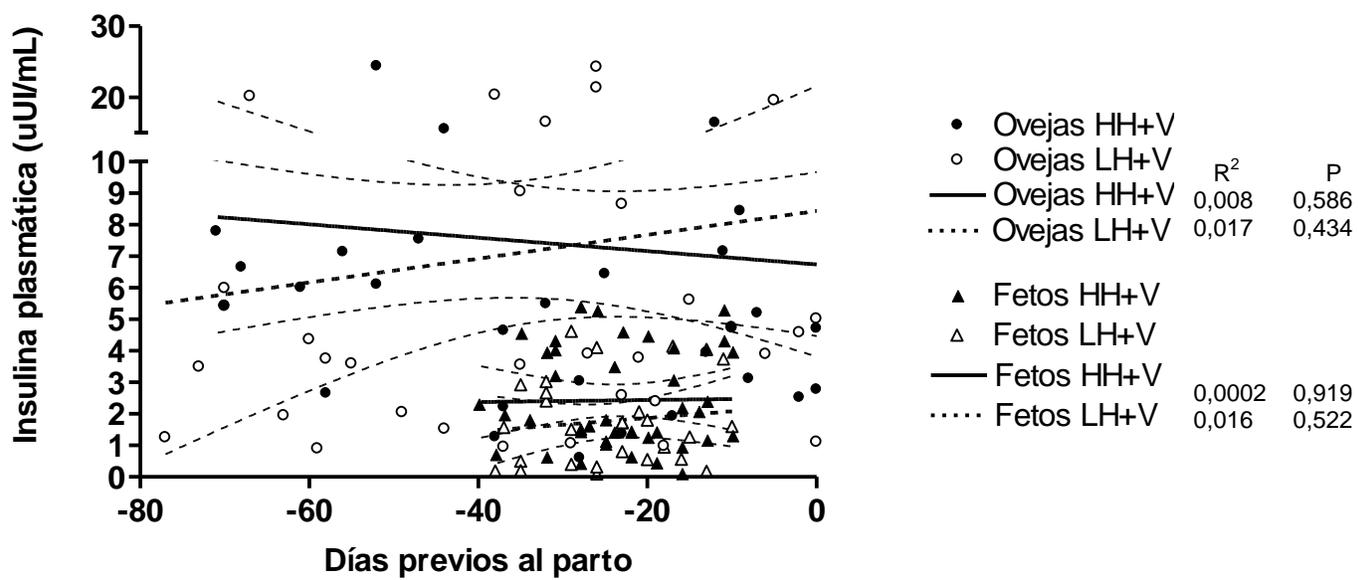
Los fetos HH+V presentaron mayores concentraciones de insulina que los fetos LH+V ($2,89 \pm 2,36$ y $1,77 \pm 1,40$ uUI/mL, respectivamente, $p < 0,05$). Cuando se compararon los valores considerando los rangos de días pre parto, aunque no existieron diferencias dentro ni entre grupos, los fetos HH+V presentaron una tendencia a valores más altos hasta el parto ($3,10 \pm 2,67$; $2,77 \pm 1,63$ y $5,49 \pm 4,80$ uUI/mL para los rangos 21-35, 6-20 y 1-5 días pre parto, respectivamente), que los fetos LH+V, quienes mantuvieron un valor estable en los rangos 21-35 y 6-20 días pre parto ($1,71 \pm 1,37$ y $1,71 \pm 1,55$ uUI/mL, respectivamente), lo que también se refleja por la posición de las curvas de regresión.

El promedio de la insulina materna fue de $7,36 \pm 5,19$ para las ovejas HH+V y de $7,94 \pm 8,21$ uUI/mL para las ovejas LH+V. Al considerar los valores de insulina en los rangos de días pre parto, no se observaron diferencias significativas entre los grupos HH+V ($5,24 \pm 5,09$; $7,53 \pm 4,80$; $7,53 \pm 4,71$ uUI/mL; para los rangos 21-35, 6-20 y 1-5, respectivamente) y LH+V ($9,47 \pm 8,35$; $9,75 \pm 11,64$; $8,1 \pm 7,19$ uUI/mL para los rangos 21-35, 6-20 y 1-5, respectivamente). Esto lo confirman las funciones de regresión, en que la pendiente es muy baja.

Como se observa en el gráfico 2, las concentraciones de insulina fetal son menores que las registradas por las madres. En el caso de los fetos, esta hormona presentó una gran dispersión, pero dentro de un rango más estrecho de 1 y 5 uUI/mL, comparado con la gran dispersión que experimentaron las madres de 1 y 25 uUI/mL, durante el transcurso de la gestación en ambos grupos.

GRÁFICO 2

Concentración plasmática de insulina materna y fetal en gestaciones de ovejas suplementadas con vitamina C y E, mantenidas a 3600 m.s.n.m.



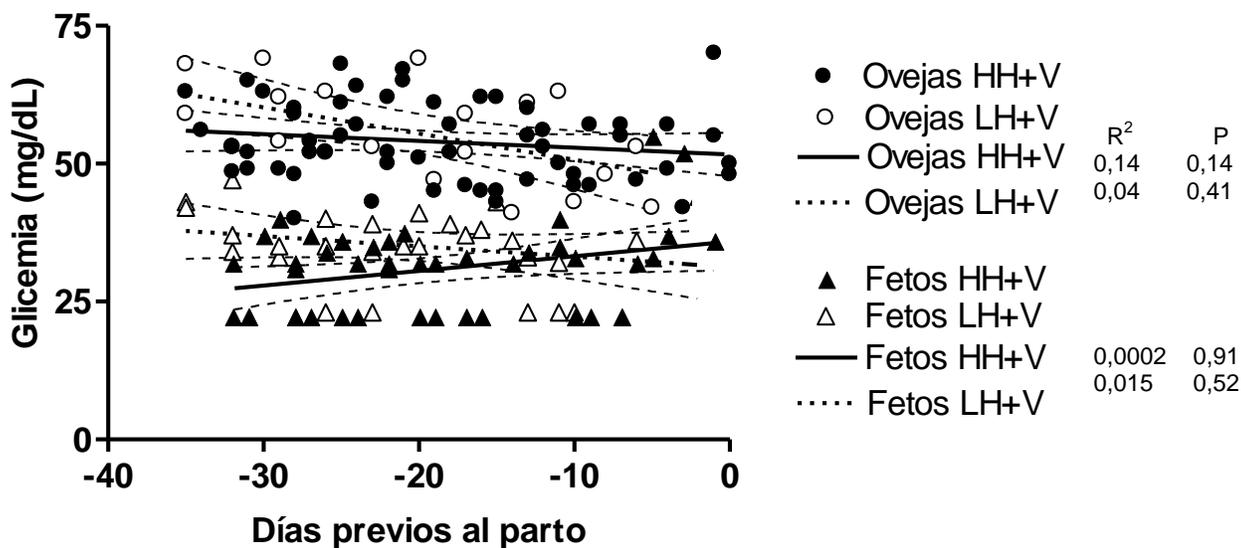
3) GLICEMIA

Las glicemias fetales demostraron tener diferencias entre los grupos, donde los fetos HH+V y LH+V tuvieron un promedio de $28,42 \pm 6,29$ y $34,41 \pm 7,16$ mg/dL, respectivamente ($p < 0,001$). Al analizar los promedios por rangos de días previos al parto, se repitió la tendencia de que los fetos LH+V presentaron mayores glicemias ($34,35 \pm 7,44$ y $34,50 \pm 7,09$ para los rangos 21-35 y 6-20, respectivamente) que los fetos HH+V ($28,67 \pm 6,51$; $28,01 \pm 6,08$ y $34,60 \pm 2,07$ para los rangos 21-35, 6-20 y 1-5 días pre parto) hasta el rango 6-20, lo que también muestran las respectivas funciones de regresión.

El promedio de glicemia materna para las ovejas HH+V fue de $58,99 \pm 18,00$ y de $61,38 \pm 15,08$ mg/dL para las ovejas LH+V. Aunque no se presentaron diferencias estadísticas significativas dentro ni entre grupos, a medida que se avanzó hacia el parto, se observó una pendiente negativa de la glicemia, tendencia que fue más marcada en las ovejas LH+V (gráfico 3). Al tomar en cuenta los promedios por rango de días previos al parto, no se observaron diferencias significativas en la glicemia materna, (LH+V = $60,6 \pm 60$; $55,40 \pm 7,80$; $83,30 \pm 27,30$; HH+V = $56,20 \pm 7,50$; $55,20 \pm 17,30$; $74,40 \pm 28,40$ mg/dL) para los rangos 21-35, 6-20 y 1-5, respectivamente, lo que coincide con la baja pendiente de la función de regresión.

GRÁFICO 3

Glicemia materna y fetal durante el último mes de gestación en ovejas suplementadas con vitamina C y E, mantenidas a 3600 m.s.n.m.



DISCUSIÓN

Es reconocido que la hipoxia genera cambios en las variables sanguíneas de los individuos expuestos a la altura, y estas modificaciones son el reflejo de ajustes metabólicos y fisiológicos realizados para poder mantenerse en forma adecuada dentro de rangos compatibles con la vida. A pesar de esto, la hipoxia induce un estado de estrés oxidativo, que lleva a alteraciones en diversas variables fisiológicas.

De acuerdo a los resultados del presente estudio, los fetos HH+V tuvieron valores levemente mayores de PaO₂ y una menor PaCO₂ que el grupo LH+V. En el caso de las madres, éstas no presentaron diferencias entre los grupos, siendo los valores muy similares entre sí.

Al comparar nuestros resultados con grupos de animales similares y mantenidos en las mismas condiciones, pero sin administración de vitaminas (Fernandois, 2003), se observó que los fetos con vitaminas demostraron tener una marcada respuesta, ya que aumentaron su PaO₂ respecto de los grupos sin tratamiento con vitaminas en un 9,72 y 25,83%, para los fetos HH+V y LH+V, respectivamente. Por otra parte, en las ovejas la PaO₂ fue incrementada en un 4,88% en el grupo LH+V y reducida en 8,25% en el grupo HH+V respecto de los grupos que no recibieron tratamiento con vitaminas, aboliéndose las diferencias observadas previamente, entre las ovejas originarias de la altura y las subidas (Fernandois, 2004). A pesar de los cambios experimentados, la PaO₂ queda en un nivel prácticamente igual para ambos grupos que consumieron vitaminas.

En el caso de la PaCO₂, al realizar también una comparación con los resultados de Fernandois (2004), se observó que los valores del grupo de fetos LH+V se redujeron en un 14,23%, respecto del equivalente grupo sin tratamiento con antioxidantes, lo que es concordante con la reducción mostrada en las ovejas LH+V de un 8% respecto del mismo grupo sin vitaminas, demostrando que los animales subidos que consumieron

antioxidantes lograron reducir sus niveles PaCO_2 a los niveles de un animal adaptado a las condiciones de altura y que los animales propios de esta condición reducen levemente sus niveles.

Cabe mencionar que la PaCO_2 , de madres y fetos de los grupos HH+V y LH+V, fue menor que la registrada por Harvey *et al.* (1993) entre los días 125 y 140 de gestación, en ovejas y fetos sometidos a hipoxia hipobárica entre los días 30 a 120 de gestación y que en los grupos normóxicos. Esto podría explicarse, ya que la hipoxia genera un aumento de la ventilación, al menos en mujeres embarazadas, lo que provoca una mayor eliminación de PaCO_2 , lo cual se evidencia en el incremento del pH sanguíneo (McAuliffe *et al.*, 2001), como también se observó en nuestro estudio.

Como se mencionó anteriormente, la hipoxia hipobárica experimentada durante la gestación reduce el peso al nacimiento (Moore, 2003; Parraguez *et al.*, 2005). Por el contrario, mayores PaO_2 están asociadas con mayor crecimiento intrauterino, lo que se corresponde con lo observado en nuestro estudio, ya que los pesos registrados en ambos grupos con mejoras en la PaO_2 fetal, sobrepasan los 4 kg en promedio, valor superior a los registrados en los recién nacidos que no consumieron vitaminas ($3,8 \pm 0,4$ y $3,37 \pm 0,27$ kg, altura y subidos, respectivamente), donde los PaO_2 fueron de $17,07 \pm 2,76$ y $13,51 \pm 3,91$ mmHg, respectivamente (Fernandois, 2004).

En los fetos, el grupo HH+V tuvo un pH levemente más alto que LH+V, lo que coincide con Yancey *et al.* (1992), donde recién nacidos de altura presentaron pH mayores que los del nivel del mar en muestras de sangre umbilical, lo que se asocia a una mayor afinidad de Hb por oxígeno. Además, se observó que los grupos con vitaminas tuvieron valores de pH significativamente mayores que los sin vitaminas registrados por Fernandois (2004), aumentando los niveles de pH sanguíneo (0,51% y 2,19 % para fetos HH+V y LH+V, respectivamente).

En las ovejas, los pH fueron prácticamente iguales entre los grupos HH+V y LH+V, y no fueron significativamente diferentes de los respectivos grupos sin vitaminas. Es reconocido que en gestaciones a gran altura se incrementa el pH sanguíneo en relación a gestaciones desarrolladas a nivel del mar (McAuliffe *et al.*, 2001). El incremento en el pH materno en la preñez presenta ventajas, ya que facilita la carga de oxígeno en el pulmón y el estado alcalótico facilita la excreción fetal de ácidos, bajo un adecuado gradiente de concentración. Esto es tan relevante como el paso de ácidos fijos a la madre lo que disminuye la afinidad de hemoglobina materna por oxígeno e incrementa la toma de oxígeno por la hemoglobina fetal y, por lo tanto, la toma de oxígeno fetal (McAuliffe *et al.*, 2001).

La concentración plasmática de hemoglobina en los fetos no presentó diferencias entre los grupos tratados con vitaminas, siendo prácticamente los mismos valores y levemente menores que los fetos sin vitaminas (Fernandois, 2004). Las ovejas HH+V y LH+V demostraron no tener diferencias en sus valores de concentración de hemoglobina, lo que de cierta forma muestra una mejora en la respuesta adaptativa de las ovejas subidas, ya que en ovejas sin vitaminas los mayores niveles los tuvo el grupo subido a la altura (Fernandois, 2003). A su vez, el grupo HH+V demostró tener mayor concentración de hemoglobina respecto de su grupo homólogo sin vitaminas (4,92% más), el más adaptado a la altura. Un aumento en la concentración de Hb materna tiene que ver con una mejor capacidad de transporte de oxígeno en la sangre (Yancey *et al.*, 1992). Por su parte, el grupo LH+V tuvo menores valores de hemoglobina comparado con su grupo equivalente sin vitaminas (Fernandois, 2003). Sin embargo, la reducción de la concentración de Hb experimentada por las ovejas LH+V, las posicionó al mismo nivel que las ovejas HH+V.

El V.G.A. en fetos no presentó diferencias significativas entre grupos con administración de vitaminas ni con los grupos sin tratamiento reportados por Fernandois (2004), a pesar de que, el VGA de los fetos HH+V y LH+V fue de 1,19 y 4,04% respectivamente más alto que los correspondientes grupos sin vitaminas antioxidantes.

En el caso de las ovejas, no se presentaron diferencias entre los grupos que consumieron vitaminas. Al comparar los V.G.A. de nuestros grupos experimentales con los que no recibieron vitaminas, se observó que las ovejas HH+V aumentaron en 2,44% su V.G.A. respecto del grupo equivalente sin vitaminas. En contraste, las ovejas LH+V tuvieron un V.G.A. de 3,048% más bajo respecto de las que no recibieron vitaminas. Esto muestra que el tratamiento con vitaminas tiende a igualar el V.G.A., situación que no se observa entre los grupos sin vitaminas, donde el grupo de ovejas subidas a la altura presentó un hematocrito significativamente mayor que el grupo de ovejas nativas de la altura (Fernandois, 2004).

Si bien la exposición a la altura genera policitemia como un mecanismo fisiológico para adaptarse a las condiciones de baja presión parcial de oxígeno y poder entregar una cantidad adecuada de oxígeno a los tejidos, el aumento del V.G.A. se considera beneficioso en la medida que no aumente exageradamente la viscosidad de la sangre, debido a que esta condición deteriora el transporte e intercambio gaseoso. En nuestro estudio, el V.G.A. materno permanece estable en ambos grupos y no disminuye durante la gestación como se describe en una gestación normal a nivel del mar (Kametas *et al.*, 2004), debido posiblemente a la menor expansión del volumen plasmático que se produce en las gestaciones de altura (Moore, 2003).

Considerando que el aumento en los niveles de hemoglobina y hematocrito se utilizan como indicadores de hipoxia materna (Khalid *et al.*, 1997), en este estudio podríamos deducir que la escasa variación de estos parámetros en las ovejas LH+V, donde el V.G.A. y la Hb se reducen respecto de su correspondiente grupo sin vitaminas, podría indicar una mejor respuesta materna a la hipoxia ambiental y, con ello, indicar que las vitaminas antioxidantes mejoran el ambiente gestacional para el desarrollo y crecimiento fetal.

La Sat Hb no registró diferencias entre los grupos de fetos tratados con vitaminas. Sin embargo, tuvieron mayores saturaciones de hemoglobina por oxígeno (6,92% y 14,95%, de aumento en HH+V y LH+V, respectivamente) que los reportados para fetos sin vitaminas (Fernandois, 2004). Esta mejora observada en la Sat Hb, coincide con los hallazgos de Bailey y Davies (2001), donde esta variable mejoró en individuos suplementados con vitaminas antioxidantes, respecto del grupo placebo. Esto muestra correspondencia con lo ocurrido con la PaO₂, lo que asegura una adecuada entrega de oxígeno a los tejidos fetales. En el caso de las madres, no presentaron diferencias de Sat Hb entre sí. Tampoco se observaron diferencias respecto de los grupos sin vitaminas (Fernandois, 2004). Sólo se constató un pequeño aumento en las ovejas LH+V (2,71%) y una leve disminución en las ovejas HH+V (1,88%) respecto de su grupo equivalente sin vitaminas. La disminución observada en las ovejas HH+V respecto de su grupo homólogo sin vitaminas, aunque leve, es consecuente con la disminución observada en los niveles de PaO₂, y es contraria a los leves aumentos observados en Hb y V.G.A. Además, la PaCO₂ permanece estable en sus niveles, por lo tanto, estos aumentos estarían destinados a hacer más eficiente la extracción de oxígeno a los tejidos. Un mayor V.G.A. y Hb permiten una mayor capacidad de transporte a través del lecho vascular y de esta forma satisfacer las demandas de oxígeno tisular. Por otra parte, en las ovejas LH+V también ocurre una situación muy particular. La saturación se incrementa respecto de las equivalentes sin vitaminas, lo que es concordante con el aumento de la PaO₂ y ocurre una disminución en las variables PaCO₂, V.G.A. y Hb. Esto evidencia una tendencia a disminuir los mecanismos de extracción de oxígeno a niveles similares de las ovejas HH+V, en la medida que mejora el aporte de oxígeno.

Resumiendo este aspecto, se puede señalar que las ovejas HH+V y LH+V igualaron sus porcentajes de Sat Hb y los fetos de ambos grupos aumentaron sus Sat Hb, igualándose de la misma forma que en las madres, invirtiendo la situación descrita por Fernandois (2004), en donde las mejores Sat Hb las presentaron sólo las madres y fetos de altura.

Respecto al diferencial arterio-venoso, se observó que las ovejas que consumieron antioxidantes durante la gestación, no mostraron diferencias significativas según el origen, pero presentaron leves cambios, aunque no significativos, respecto de sus correspondientes grupos sin vitaminas (Fernandois, 2004). Las ovejas HH+V tuvieron un leve aumento (5,55%) en el diferencial a-v respecto del correspondiente grupo sin vitaminas y, por ende, de la extracción de oxígeno (0,63%). Por otra parte, disminuyó el diferencial a-v (-22,6%) y la extracción de oxígeno (-6,68%) en las ovejas LH+V en comparación a su homólogo sin vitaminas (Fernandois, 2004). A pesar de la disminución experimentada por las ovejas LH+V, el diferencial a-v siguió siendo mayor en estas últimas, respecto de las ovejas HH+V.

Por otro lado, aunque no significativa, la diferencia a-v en los fetos fue 42% mayor en el grupo HH+V comparado con el LH+V. Al comparar los fetos con sus respectivos grupos sin vitaminas (Fernandois, 2004), los fetos con vitaminas presentaron un incremento en el diferencial a-v y en la extracción de oxígeno. Este aumento fue de mayor relevancia en los fetos LH+V (166%) ($p < 0,05$), lo que sumado a la reducción del diferencial a-v y extracción de oxígeno observado en las madres, podría explicar el aumento del diferencial a-v y extracción de oxígeno registrado en los fetos, dando como resultado una mayor cantidad de oxígeno disponible para el feto. El hecho de que los fetos HH+V incrementaran su diferencial a-v y extracción, a pesar del leve incremento de estos patrones observados en sus madres, podría deberse a que la Sat Hb en estos fetos fue incrementada, lo que se tradujo en mayores CaO_2 , y por lo tanto, en un aumento de la extracción y diferencial a-v.

La situación de las ovejas HH+V, respecto de lo reportado por Fernandois (2004), para ovejas originarias de la altura, pero sin vitaminas, donde se registró sólo un leve aumento en el diferencial a-v y en la extracción de oxígeno, se podría atribuir a que son animales ya adaptados a la altura, y por lo tanto, el uso de antioxidantes mejoró sólo marginalmente estas variables. En cambio, la reducción de estas mismas variables en las ovejas LH+V, podría deberse a que producto de los antioxidantes, las variables sanguíneas se estabilizan

y tienden a parecerse al grupo HH+V (PaO₂, PaCO₂, pH, VGA, Hb, Sat Hb) y por lo tanto, el diferencial a-v y la extracción caen. A pesar de esto, el diferencial a-v y la extracción siguen siendo mayores en las ovejas LH+V, en relación a las ovejas HH+V, posiblemente porque si bien los antioxidantes le confieren una mejor respuesta adaptativa, esta no es equivalente a la adaptación de las ovejas de altura desarrollada a través de generaciones, donde, si bien los valores no son tan elevados, pueden igualmente satisfacer sus demandas metabólicas. Similar situación ocurre con los fetos, ya que la administración de antioxidantes logró acercar las variables sanguíneas de los fetos LH+V con los HH+V (PaO₂, PCO₂, pH, VGA, Hb y Sat Hb).

Con respecto a las variables endocrinas, las concentraciones plasmáticas de cortisol fetal, no presentaron diferencias entre los grupos tratados con vitaminas. Tampoco se observaron diferencias al compararlos con los valores registrados para fetos sin administración de vitaminas (Fernandois, 2004). Sin embargo, los valores recopilados en nuestro estudio fueron menores a los valores de cortisol registrados para fetos ovinos gestados a nivel del mar desde los 124 a 140 días de gestación, en un estudio previo realizado por Parraguez *et al.* (1989). Lo anterior concuerda con lo expuesto en trabajos previos (Harvey *et al.*, 1993; Myers *et al.*, 2005), donde existiría una limitación en la síntesis de cortisol a nivel fetal en la última etapa de la gestación en fetos bajo hipoxia crónica, lo cual sería un mecanismo de protección para evitar una potencial restricción de crecimiento intrauterino. Sin embargo, en una gestación normal, días u horas previos al parto se produce un alza marcada en el cortisol fetal que preparan al feto para la vida extrauterina (Fisher, 1998). En nuestro estudio, a pesar de que no fue significativo, se observó un leve aumento en el cortisol fetal del grupo HH+V durante los rangos 6 a 20 y 21 a 35 días pre parto respecto a lo reportado para el grupo correspondiente sin vitaminas (Fernandois, 2004) y un aumento final de cortisol (1 a 5 días pre parto), que en promedio fue mayor en los fetos HH+V respecto de los de altura no tratados, lo que podría ser indicativo de una mejora en la síntesis de la adrenal fetal para esta hormona. El alza tardía de cortisol es de vital importancia para el desarrollo postnatal, debido a que aumenta la síntesis de surfactante y la reabsorción de líquido pulmonar, disminuye la sensibilidad del ducto arterioso a las prostaglandinas, lo que facilita su cierre, estimula la maduración de

enzimas hepáticas, entre otros (Fisher, 1998), todos procesos fundamentales para iniciar la vida extrauterina.

En el caso de las concentraciones plasmáticas de cortisol materno, podemos decir que en los grupos de ovejas que consumieron antioxidantes, no se observaron diferencias, aunque el grupo LH+V tuvo una tendencia a mayores aumentos al final de la gestación. Cuando se compararon los grupos con vitaminas con sus correspondientes grupos sin vitaminas (Parraguez*, datos no publicados) se observó una drástica reducción de los valores en ambos grupos a niveles similares (63,75% menos, significativo sólo para el grupo HH+V). Es importante considerar que se ha reportado que las concentraciones de cortisol materno son más elevadas en gestaciones desarrolladas en la altura, ya que se encontró un aumento del 50% en ovejas preñadas en respuesta a hipoxemia de largo plazo a gran altura (Harvey *et al.*, 1993). Por lo tanto, esta reducción de cortisol respecto de los grupos de ovejas no tratadas, pero con niveles igualmente altos, como se observó en los grupos HH+V y LH+V, representaría un reajuste a las condiciones de hipoxia de altura, posiblemente favorecido por el efecto antioxidante presente que no hizo necesario un incremento marcado en la concentración de cortisol materno, como se describe durante una gestación en la altura.

Jensen *et al.* (2005) investigaron los efectos de las concentraciones de cortisol materno sobre la gestación, para lo cual trabajaron con grupos de ovejas preñadas, a uno de los cuales se le infundió cortisol para lograr niveles de cortisol alto (27,6 nMol/L) y otro grupo que fue adrenalectomizado e infundido con cortisol para lograr bajos niveles circulantes de esta hormona (19,31 nMol/L), desde el día 120 a 130 de gestación. Como resultado se observó que, las ovejas pertenecientes al grupo de cortisol alto experimentaron una disminución del crecimiento fetal. En nuestro estudio, los niveles de cortisol materno registrados superan a los valores registrados por Jensen *et al.* (2005), para el grupo de cortisol alto. Sin embargo, el efecto de restricción de crecimiento no se produjo, ya que los pesos al nacimiento fueron mayores en los grupos HH+V y LH+V

* Parraguez, V.H., Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

respecto de animales mantenidos a la misma altura (Parraguez *et al.*, 2006). Además, la PaO₂ fetal, que es un reflejo del flujo sanguíneo uterino, mejoró, lo que podría indicar que, a pesar de que existen niveles levemente altos de cortisol materno, no hay un efecto detrimental de esta hormona sobre la estructura placentaria y el crecimiento fetal. La reducción materna del cortisol, a un valor similar para ambos, sería una consecuencia del mejorado estatus antioxidante experimentado por los grupos que consumieron vitaminas, que resultó ser positivo para llevar a cabo un crecimiento fetal satisfactorio.

La concentración plasmática de insulina entre los grupos de fetos con vitaminas fue mayor en el grupo HH+V (63,27%), respecto del LH+V hasta el día 10 previo al parto. Además, el grupo HH+V fue significativamente mayor (85,25%) que el grupo análogo sin vitaminas hasta el día del parto (Parraguez*, datos no publicados). Lo observado en los fetos HH+V concuerda con las madres, al aumentar las concentraciones de insulina plasmática. Lo anterior, podría tener explicación en el hecho de que, al mejorar la oxigenación, se produce un aumento en la secreción de insulina como se ha observado en fetos ovinos en respuesta a hiperglicemia en condiciones de hiperoxia (Jackson *et al.*, 2000). Asimismo, los valores de insulina observados para los fetos con vitaminas son mayores a los registrados en fetos controles normóxicos (Jackson *et al.*, 2000). Esto explicaría los menores valores encontrados en fetos subidos respecto de los fetos nativos de altura, ya que tuvieron un menor tiempo de adaptación a esta condición, produciendo una concentración de insulina intermedia entre ambas situaciones.

Respecto de la glicemia, el grupo de fetos LH+V tuvo mayores valores, pero menores concentraciones de insulina durante los rangos de días previos al parto que el grupo HH+V. Dado que los pesos al nacimiento fueron similares entre estos grupos, podría indicarse que igualmente son eficientes en la utilización de glucosa, y que podría existir un alta sensibilidad a la insulina por parte de los tejidos, situación observada por Krampfl (2001) en mujeres que presentan bajas concentraciones de insulina plasmática.

* Parraguez, V.H., Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Las ovejas no mostraron diferencias significativas respecto de la concentración plasmática de insulina entre los grupos con vitaminas, sin embargo, fueron mayores respecto de lo descrito en ovejas mantenidas a la misma altura, pero sin vitaminas (Parraguez*, datos no publicados). El grupo HH+V presentó un incremento significativo del 40,72% respecto del correspondiente grupo sin vitaminas y un leve aumento en el grupo de ovejas LH+V, manteniendo la relación de igualdad observada entre los grupos sin vitaminas.

La inhibición α -adrenérgica de la síntesis de insulina descrita por Jackson *et al.* (2000), como respuesta aguda a la hipoxia, difiere de una gestación desarrollada en su totalidad bajo hipoxia crónica como en el presente estudio. Sin embargo, pone de manifiesto los efectos α -adrenérgicos que se desencadenan bajo una reducción de la disponibilidad de oxígeno, lo que podría en parte, ayudar a explicar las reducciones de esta hormona en gestaciones de altura. Según lo observado en este estudio, y considerando lo anterior, al mejorar la disponibilidad de oxígeno fetal, la acción α -adrenérgica posiblemente sea disminuida y, por lo tanto, este leve efecto supresor de la síntesis desaparezca, posibilitando los aumentos de insulina registrados en las madres y fetos de altura tratados con vitaminas antioxidantes. Además, los incrementos registrados en la insulina materna en este estudio, podrían ser una consecuencia del incremento de la glicemia, debido a la mejora en las variables sanguíneas atribuidas al uso de antioxidantes, presentándose aumentos proporcionales, pero contrarios a lo observado por Krampl (2001), donde bajas glicemias presentan bajas concentraciones de insulina en mujeres que gestan a gran altura. A su vez, la insulina es un promotor del crecimiento fetal (Fowden y Forhead, 2004) y su aumento favorece el desarrollo, lo que se pudo haber expresado en los aumentos de peso al nacimiento registrados en ambos grupos.

Lo anterior pasa a ser relevante si consideramos que glucosa e insulina están estrechamente ligadas (Jackson *et al.*, 2000), ya que la secreción y acción de la insulina son afectadas por las concentraciones de glucosa presentes y de la cantidad y actividad de los transportadores de glucosa tisular (Hay, 2006). Asimismo, la insulina se correlaciona positivamente con variables sanguíneas umbilicales como pH, PaO₂ y Sat Hb, y negativamente con la PaCO₂ (Verhaeghe *et al.*, 2005). Lo anterior coincide con lo

* Parraguez, V.H., Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

registrado en nuestro estudio, ya que estas variables se incrementaron en ambos grupos de fetos con vitaminas, salvo la PaCO_2 , que fue reducida, lo que junto con los aumentos de insulina en fetos de altura, ayudan a respaldar esta aseveración.

Los aumentos observados en la insulina, concuerdan con el hecho de que al aumentar el aporte de nutrientes al feto, se incrementan los niveles de hormonas anabólicas (insulina, tiroxina, IGF-I) y reducen los niveles de hormonas catabólicas en la circulación fetal (cortisol, catecolaminas) (Fowden y Forhead, 2004). Al mejorar en conjunto la glicemia y la oxigenación fetal como resultado de la administración de antioxidantes, eventualmente, se lograría una adecuada organogénesis y funcionalidad pancreática, que permiten un adecuado crecimiento como se observó en los fetos HH+V.

Los resultados de este estudio demostraron que las glicemias maternas y fetales de los grupos con vitamina alcanzaron mayores valores que los grupos sin vitaminas (Parraguez*, datos no publicados), con un 15,91% y 9,88% de aumento en las ovejas HH+V y LH+V, y un 25,19% y 28,39% de aumento en los fetos HH+V y LH+V, respectivamente. Además, hasta el día del parto, las glicemias fetales del grupo HH+V fueron mayores que las del grupo correspondiente sin vitaminas. Con estos aumentos, se cambia la relación observada en la glicemia fetal de los grupos no tratados, los cuales no presentaron diferencias y en nuestro estudio los fetos LH+V presentaron mayor glicemia. Estos resultados junto con los aumentos en la PaO_2 confirman lo observado por Charlton y Creasy (1977), donde los fetos mejor oxigenados presentan mayores glicemias y además sus glicemias son proporcionales a las encontradas en sus madres. En el caso de los fetos LH+V que tuvieron mayor glicemia, podría explicarse porque la mejora en la PaO_2 respecto de sus homólogos sin vitaminas (25% más), fue mayor que en los fetos HH+V respecto de sus correspondientes sin vitaminas y posiblemente este cambio en los niveles de oxígeno, explicarían una glicemia más alta en los fetos subidos tratados con vitamina.

* Parraguez, V.H., Facultad de Cs. Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Paradójicamente, las glicemias registradas en los grupos de fetos con vitaminas fueron mayores a los registros de fetos controles bajo normoxia observados por Jackson *et al.* (2000). Esto podría ser explicado por un posible aumento de flujo sanguíneo hacia el feto, ya que la glicemia materna en las ovejas tratadas con vitaminas resultaron ser similares a sus pares del nivel del mar. Por lo tanto, la diferencia no estaría explicada por un aumento en la glicemia materna.

La mayor glicemia materna registrada en los grupos que consumieron vitaminas respecto de los no tratados, podría ser consecuencia de que al existir una mayor disponibilidad de agentes antioxidantes (vitamina C y E), el glutatión oxidado sería reconvertido a glutatión reducido con mayor facilidad, lo que se traduciría en una menor demanda de utilización de glucosa por parte del ciclo de las pentosas para mantener un nivel adecuado de NADPH disponible para contrarrestar la disminución de glutatión reducido y mantener un estado redox normal en las células (Fang *et al.*, 2002). De esta forma, existiría una mayor cantidad de glucosa disponible para ser utilizada en otros procesos metabólicos. Esto podría ser importante, debido a que la gestación tiene mayores requerimientos y más aún si ésta se desarrolla en la altura.

El feto necesita para su desarrollo y crecimiento una adecuada suplementación de oxígeno y nutrientes, lo que es mediado por la placenta. Si existe hipoxia placentaria, producto de la hipoxia materna generada por la exposición a gran altura, esta entrega va a ser deteriorada y repercute en el feto, que se expresa en un menor peso al nacimiento, ya que existe una correlación negativa entre peso al nacimiento e hipoxia placentaria (Khalid *et al.*, 1997). El hecho de que en este estudio los pesos al nacimiento aumentaran, puede ser indicativo de que parte de la hipoxia placentaria y su consecuente estrés oxidativo fue abolido por los antioxidantes y con ello, haya mejorado la capacidad de transporte de glucosa, debido al posible bloqueo del efecto inhibitorio de la expresión de transportadores de glucosa en la placenta inducido por la hipoxia, como señala Zamudio (2003). Así, un constante aporte de glucosa previene la necesidad de gluconeogénesis fetal y de una mayor actividad de las enzimas gluconeogénicas en el hígado fetal (Fisher, 1998).

Si se considera que una mayor glicemia materna se tradujo en una mayor glicemia fetal, con el correspondiente aumento en la insulina y, las mejoras en los niveles sanguíneos fetales de PaO₂ y Sat Hb observados en los grupos con antioxidantes, se podría sospechar de una concomitante mejora en la perfusión y flujo sanguíneo placentario. Lo anterior puede ser respaldado por los efectos atribuidos a las hormonas maternas, estradiol y progesterona, sobre la circulación placentaria, al promover el crecimiento y dilatación de los vasos sanguíneos asegurando la mejor irrigación placentaria. Con respecto a esto, la administración de vitamina C y E a ovejas preñadas en la altura, aumentaron las concentraciones de esteroides ováricos (Parraguez y Atlagich, 2006). Esto se ve apoyado por el aumento de la perfusión placentaria en mujeres con preclampsia que fueron suplementadas con vitamina C y E durante el embarazo (Chappell *et al.*, 2002). Adicionalmente, está demostrado que infusiones prolongadas (días) de estradiol en la arteria pulmonar de fetos ovinos, incrementan el flujo sanguíneo pulmonar en la gestación tardía, demostrando sus propiedades vasoactivas (Parker *et al.*, 2000).

En relación con lo anterior, mujeres del Tibet, que poseen una milenaria adaptación a la altura, presentan un mayor flujo sanguíneo a la arteria uterina, pero tienen un CaO₂ más baja comparado con mujeres a similar altitud, pero de menor tiempo de adaptación. Sin embargo, los pesos al nacimiento son mayores en las mujeres tibetanas (Moore, 2003). Esto último corresponde a adaptaciones que se han desarrollado durante sucesivas generaciones con el fin de proteger contra la restricción de crecimiento intrauterino, producto de la exposición a la gran altura (Moore, 2003).

Respecto a lo observado por Lee *et al.* (2004), quienes describieron una asociación positiva entre los niveles de vitamina C y E en el embarazo con el peso y tamaño de los recién nacidos, podría atribuirse a la disminución del estrés oxidativo mediado por las vitaminas antioxidantes, ya que, la suplementación con vitamina C y E a ovejas originarias de la altura y ovejas del nivel del mar que gestaron a 3600 m.s.n.m., redujo significativamente los niveles de marcadores sanguíneos de estrés oxidativo (Parraguez, datos no publicados), lo que se tradujo en mejoras en las variables sanguíneas fetales y en mejores pesos al nacimiento. Lo anterior concuerda con la disminución de los niveles de TBARS (sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico) y carbonilos, en ratas gestantes con

diabetes inducida, a las cuales se les administró vitaminas C y E, y con ello, la reducción de la presentación de malformaciones fetales y reabsorciones embrionarias asociadas a la preñez diabética, dejando de manifiesto la participación de los radicales libres en la génesis de esta alteración, y por lo tanto, demostrando los efectos positivos de estas vitaminas como tratamiento preventivo (Cederberg *et al.*, 2001).

Por lo tanto, las mejoras observadas en las variables sanguíneas fetales, principalmente glucosa y PaO₂, sirven para entender que el mayor peso al nacimiento de los corderos observados en este estudio se podría atribuir a una mayor disponibilidad de oxígeno y glucosa y a una menor producción de ROS para llevar a cabo un adecuado desarrollo y crecimiento fetal intrauterino.

Asimismo, los pesos al nacimiento de los corderos registrados en nuestro estudio, tanto del grupo HH+V y LH+V, superaron a los registrados por Parraguez *et al.* (2005), en corderos bajo similares condiciones, pero que no consumieron antioxidantes, e incluso llegan a ser equivalentes al peso de corderos nacidos a nivel del mar. Desde este punto de vista, no se manifestó el efecto de restricción de crecimiento y menor peso al nacimiento documentado en gestaciones desarrolladas a gran altura (Moore, 2003; Parraguez *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

- La administración de vitamina C y E abolió las diferencias descritas previamente para las variables sanguíneas no endocrinas entre ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura. En el caso de los fetos, aun cuando los valores son parecidos, se mantuvo una menor PaO₂ y mayor PaCO₂ en los fetos gestados por madres no adaptadas a la altura.
- La administración de vitaminas C y E generó diferencias en las variables endocrinas según el lugar de origen, donde los fetos gestados por madres subidas a la altura presentaron una mayor glicemia y menor concentración de insulina plasmática que los fetos gestados por ovejas nativas de la altura, con similar glicemia materna. Sin embargo, no tuvo mayor efecto en los valores de cortisol plasmático fetal.
- Comparado con animales sometidos a las mismas condiciones y orígenes, pero no tratados con vitaminas, la administración de vitaminas C y E mejoró las variables sanguíneas y endocrinas fetales en grupos de altura y subidos, incrementando la PaO₂, Sat Hb, pH y glicemia y sólo en los fetos de altura aumentó la insulina plasmática, sin modificaciones en el cortisol. Las mejoras en las variables observadas contribuyeron al aumento de peso al nacimiento registrado en los corderos que consumieron vitaminas durante su gestación.

BIBLIOGRAFÍA

- **ASKEW, E.** 2002. Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients. *Toxicology* 180: 107-119.
- **BAILEY, D.; DAVIES, B.** 2001. Acute mountain sickness; prophylactic benefits of antioxidant vitamin supplementation at high altitude. *High Alt. Med. Biol.* 2: 21-29.
- **BEALL, C.** 2003. High-altitude adaptations. *The Lancet* 362, Research Library Core, S14-15.
- **BOLISETTY, S.; NAIDOO, D.; LUI, K.; KOH, T.; WATSON, D.; WHITEHALL, J.** Antenatal supplementation of antioxidant vitamins to reduce the oxidative stress at delivery--a pilot study. *Early Hum. Develop. Abstract* (67: 47-53) 2002.
- **CAPPER, J.; WILKINSON, R.; KASAPIDOU, E.; PATTINSON, S.; MACKENZIE, A.; SINCLAIR, L.** 2005. The effect of dietary vitamin E and fatty acid supplementation of pregnant and lactating ewes on placental and mammary transfer of vitamin E to the lamb. *Br. J. Nutr.* 93: 549-557.
- **CEDERBERG, J.; SIMÁN, M.; ERIKSSON, U.** 2001. Combined treatment with vitamin E and vitamin C decreases oxidative stress and improves fetal outcome in experimental diabetic pregnancy. *Pediatr. Res.* 49: 755–762.
- **CHAPPELL, L.; SEED, P.; KELLY, F.; BRILEY, A.; HUNT, B.; CHARNOCK-JONES, 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.
- **CHARLTON, V.; CREASY, R.** 1977. Glucose and oxygen metabolism in normally oxygenated and spontaneously hypoxemic fetal lambs. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 127: 499-504.
- **DE CAROLIS, G.** 1987. Descripción del sistema ganadero y hábitos alimentarios de camélidos domésticos y ovinos en el bofedal de Parinacota. Memoria para optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo. U de Chile, Fac. Cs. Agrarias y Forestales. 261 p.
- **FANG, Y.; 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. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. 54 p.

- **FISHER, D.** Endocrinology of fetal development. En: WILLIAMS, R.; WILSON, J.; FOSTER, D. Williams textbook of endocrinology 9th edition. Edit. Saunders, 1998. pp 1273-1295.
- **FOWDEN, A.; FORHEAD, A.** 2004. Endocrine mechanisms of intrauterine programming. *Reproduction*. 127: 515-526.
- **GITTO, E.; REITER, R.; KARBOWNIK, M.; TAN, D.; GITTO, P.; BARBERI, S.; BARBERI, I.** 2002. Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal Period. *Biol. Neonate*. 81: 146–157.
- **GORALCZYK, R.; MOSER, U.; MATTER, U.; WEISER, H.** 1992. Regulation of steroid hormone metabolism requires L-ascorbic acid. *Ann. N Y Acad. Sci.* 669: 349-351.
- **GORTNER, L.; HILGENDORFF, A.; BAHNER, T.; EBSER, M.; REISS, I.; RUDLOFF, S.** 2005. Hypoxia-induced intrauterine growth retardation: effects on pulmonary development and surfactant protein transcription. *Biol. Neonate*. 88: 129-135.
- **GUTIÉRREZ, M.** Estrés oxidativo en la gestación: ¿Una nueva óptica en la atención a la embarazada? [en línea]. *Rev. Cubana Obstet. Ginecol.* Ene.-abr. 2005, vol. 31, no.1 p.0-0.<http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0138-600X2005000100007&lng=es&nrm=iso> [consulta 20 junio 2006].
- **HAFEZ, E.; JAINUDEEN, M.** Gestación, fisiología prenatal y parto. En: Reproducción e inseminación artificial en animales. 4^a edición. México, D.F. McGraw-Hill-Interamericana, 2002. pp. 144-158.
- **HARVEY, L.; GILBERT, R.; LONGO, L.; DUCSAY, C.** 1993. Changes in ovine fetal adrenocortical responsiveness after long-term hypoxemia. *Am. J. Physiol.* 264 (Endocrinol. Metab.) 27: E741-E747.
- **HAY, W.** 2006. Recent observations on the regulation of fetal metabolism by glucose. *J Physiol.* 572.1: 17-24.
- **JACKSON, B., PIASECKI, G., COHN, H.; COHEN, W.** 2000. Control of fetal insulin secretion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279: R2179-R2188.
- **JENSEN, E.; WOOD, C.; KELLER-WOOD, M.** 2005. Chronic alterations in ovine maternal corticosteroid levels influence uterine blood flow and placental and fetal growth. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: 54-61.
- **KAMETAS, N.; KRAMPL, E.; MCAULIFFE, F.; RAMPLING, M.; NICOLAIDES, K.** 2004. Pregnancy at high altitude: a hyperviscosity state. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 83: 627–633.

- **KIM, Y.; HONG, Y.; LEE, K.; PARK, H.; PARK, E.; MOON, H.; HA, E.** 2005. Oxidative stress in pregnant women and birth weight reduction. *Reprod. Toxicol.* 19: 487-492.
- **KHALID, M.; ALI, M.; ALI, K.** 1997. Full-term birth weight and placental morphology at high altitude. *Int. J. Gynecol. Obstet.* 57: 259-265.
- **KRAMPL, E.; KAMETAS, N.; NOWOTNY, P.; RODEN, M.; NICOLAIDES, K.** 2001. Glucose metabolism in pregnancy at high altitude. *Diabetes Care* 24: 817-822.
- **LEE, B.; HONG, Y.; LEE, K.; KIM, Y.; CHANG, N.; PARK, E.; PARK, H.; HANN, H.** 2004. Influence of maternal serum levels of vitamins C and E during the second trimester on birth weight and length. *Eur. J. Clin. Nutr.* 1-7.
- **MCAULIFFE, F.; KAMETAS, N.; KRAMPL, E.; ERNSTING, J.; NICOLAIDES, K.** 2001. Blood gases in pregnancy at sea level and at high altitude. *British J. Obstet. Gynaecol.* 108: 980-985.
- **MOORE, L.** 2003. Fetal growth restriction and maternal oxygen transport during high altitude pregnancy. *High Alt. Med. Biol.* 4: 141-156.
- **MYERS, D., HYATT, K.; MLYNARCZYK, M.; BIRD I.; DUCSAY, C.** 2005. Long term hypoxia represses the expression of key genes regulating cortisol biosynthesis in the near term ovine fetus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: R1707-R1714.
- **NRC,** 1985. Nutrient requirements of sheep, 6 th ed. National Academy Press, Washington, DC, USA, p. 45.
- **PACHLA, L.; KISSINGER, P.** 1979. Analysis of ascorbic acid by liquid chromatography with amperometric detection. *Methods Enzymol.* 62: 15-24.
- **PARKER, T.; KINSELLA, J.; GALAN, H.; LE CRAS, T.; RICHTER, G.; MARKHAM, N.; ABMAN, S.** 2000. Prolonged infusions of estradiol dilate the ovine fetal pulmonary circulation. *Pediatr. Res.* 47: 89–96.
- **PARRAGUEZ, V. H.; VERGARA, M.; RIQUELME, R.; RAIMANN, R.; LLANOS, A.; SERÓN-FERRÉ, M.** 1989. Ontogeny of the circadian rhythm of cortisol in sheep. *Biol. reprod.* 40:1137-1143.
- **PARRAGUEZ, V. H.; ATLAGICH, M.; DÍAZ, R.; BRUZZONE, M.; BEHN, C.; RAGGI, L.** 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.; BEHN, C.; RAGGI, L.** 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.** 2006. Reproducción animal en la altura. Simposio Reproducción en animales domésticos. En: XVII Reunión anual de la sociedad chilena de reproducción y desarrollo. 10-12 agosto. Reñaca, Chile.
- **PARRAGUEZ, V. H.; ATLAGICH, M.; DÍAZ, R.; CEPEDA, R.; GONZÁLEZ, C.; DE LOS REYES, M.; BRUZZONE, M. E.; BEHN, C.; RAGGI, L. A.** 2006. Ovine placental at high altitudes: comparison of animals with different time of adaptation to hypoxic environment. *Anim. Reprod. Sci.* 5: 151-157.
- **PHILIPPS, A.; ROSENKRANTZ, T.; CLARK, R.; KNOX, I.; CHAFFIN, D.; RAYE, J.** 1991. Effects of fetal insulin deficiency on growth in fetal lambs. *Diabetes* 40: 20-27.
- **RICHARDSON, B.; BOCKING, A.** 1998. Metabolic and circulatory adaptations to chronic hypoxia in the fetus. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A : 717-723.
- **SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A.** 1992. Antioxidant functions of vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann. N Y Acad. Sci.* 669: 7-20.
- **SIMON-SCHNASS, I.** 1996. Oxidative stress at high altitudes and effects of vitamin E. En: Marriott, B.M.; Carlson, S.J. (Eds.). Nutritional needs in cold and high altitude environments. National Academy Press, Washington, DC. 393-418.
- **VERHAEGHE, J.; VAN BREE, R.; VAN HERCK, E.; COOPMANN, W.** 2006. Exogenous corticosteroids and in utero oxygenation modulate indices of fetal insulin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 90: 3449-3453.
- **WANG, X.; QUINN, P.** 1999. Vitamin E and its function in membranes. *Progr. lipid res.* 38: 309-336.
- **YANCEY, M.; MOORE, J.; BRADY, K.; MILLIGAN, D.; STRAMPEL, W.** 1992. The effect of altitude on umbilical cord blood gases. *Obstet Gynecol.* 79: 571-574.
- **ZAMUDIO, S.** 2003. The placenta at high altitude. *High Alt. Med. Biol.* 4: 171-191.
- **ZHAO, B.; THAM, S.; LU, J.; LAI, M.; LEE, L.; MOOCHALA, S.** 2004. Simultaneous determination of vitamins C, E and B-carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J. Pharmaceut. Sci.* 7: 200-204.

