



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

**“EFECTO DE LA HIPOXIA HIPOBÁRICA Y LA SUPLEMENTACIÓN
CON VITAMINA C Y E EN LA DOTACIÓN FOLICULAR OVÁRICA
DE OVINOS ADAPTADOS Y NO ADAPTADOS A LA ALTURA”**

MARIE PAULINE ALLAMAND TURNER

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

PROFESOR GUÍA: DR. VÍCTOR HUGO PARRAGUEZ GAMBOA
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1100189

SANTIAGO, CHILE
2014

RESUMEN

En ambientes de altura, la fertilidad de las ovejas se ve afectada negativamente por efecto de la hipoxia, el estrés oxidativo o ambos. Este efecto ha logrado ser revertido en algunos casos con la suplementación de vitaminas antioxidantes.

Los efectos de la altura podrían verse reflejados en la estructura y función ovárica, por lo que es este trabajo se estudiaron las poblaciones foliculares en ovarios de ovejas nativas de altura, recientemente expuestas a la altura y ovejas del nivel del mar, tratadas y no tratadas con vitaminas C y E. Las poblaciones foliculares fueron estudiadas mediante observación microscópica de cortes histológicos provenientes de ovarios extraídos quirúrgicamente al día 5 del ciclo estral. La población folicular fue clasificada según estadio de desarrollo en folículos primordiales, folículos en crecimiento, folículos preovulatorios, folículos atrésicos y cuerpos lúteos.

Los resultados mostraron que la hipoxia hipobárica causa una disminución del número de folículos primordiales, folículos en crecimiento y folículos atrésicos. En el caso del recuento de cuerpos lúteos, se encontró que las ovejas que ciclaban en altura tendían a aumentar el número de estos. Los folículos preovulatorios no mostraron diferencias. Además, se pudo demostrar que el efecto negativo de la hipoxia hipobárica sobre los folículos primordiales y en crecimiento pudo ser parcialmente revertido al suplementar a las ovejas con vitaminas antioxidantes C y E lo que nos indica que el daño provocado en estas poblaciones foliculares se debe, en parte, al estrés oxidativo producto de la hipoxia. Con los resultados de este estudio se puede concluir que la exposición a hipoxia hipobárica no afecta a todos los componentes de la dotación folicular ovárica y que, el daño oxidativo está presente solo en el caso de los folículos primordiales y en crecimiento. Aun cuando se pudieron demostrar efectos negativos de la hipoxia y el estrés oxidativo sobre la dinámica folicular, no se pudo respaldar que la hipoxia o el estrés oxidativo logren afectar el resultado final de esta.

ABSTRACT

At high altitudes, hypoxia, oxidative stress or both compromise sheep fertility. In the present work, we tested the relative effect of short- or long-term exposure to high altitude hypobaric hypoxia and oxidative stress on the ovarian follicular size populations in cycling sheep.

The frequency of the different follicular types and corpus luteum were evaluated by microscope observation of ovary slices obtained from sheep native or naïve to high-altitude and kept at high altitude, and sheep native and kept at sea level, either supplemented or not supplemented with antioxidant vitamins. The ovaries were removed on the fifth day of de estrous cycle and the follicular stages were identified using microscopy as either primordial, growing, pre-ovulatory, atretic or corpus luteum.

The results showed that the hypobaric hypoxia decreased primordial, growing and atretic follicles. In the case of corpora lutea, it was found a trend to decrease in ewes who cycled at high. Pre-ovulatory follicles didn't show difference at all. We also demonstrated that the negative effect of hypobaric hypoxia on the primordial and growing follicles could be partially reversed by administration of vitamins C and E, indicating that the hypoxic damage on this follicular populations is partially to oxidative stress.

In conclusion, exposure to hypobaric hypoxia of native or naïve high altitude sheep does not affect all components of the ovarian follicular population. In addition, oxidative stress might be responsible of damage was observed only in the case of primordial and growing follicles. Although this study shows negative effects of hypoxia and oxidative stress on follicular dynamics, it could not support that hypoxia or oxidative stress affect the final result of the follicular dynamics.

INTRODUCCIÓN

En condiciones ambientales normales a nivel del mar, la presión atmosférica es de 760 mm Hg. En estas condiciones el oxígeno ocupa 21 volúmenes % del aire ambiente, su presión parcial también es el 21% de la presión atmosférica, o sea 160 mm Hg. Esta condición es denominada normoxia. A medida que se incrementa la altura sobre el nivel del mar, la presión atmosférica disminuye, por ejemplo, siendo de 523 mmHg a 3000 metros sobre el nivel del mar y, consecuentemente, la presión parcial de oxígeno (PO_2) también disminuye. Esta disminución de la PO_2 es denominada hipoxia hipobárica, situación que desencadena en los animales una serie de respuestas fisiológicas con el fin de contrarrestar los efectos de la baja tensión de O_2 . Sumado a lo anterior, el organismo que se encuentre en la altura se debe adaptar también a la baja humedad relativa, la gran fluctuación térmica y la elevada radiación solar (Guyton y Hall, 2001).

Según la Asociación Latino-Americana de Especialistas de Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos, solo en Latinoamérica la población de ovinos criados sobre los 2500 m.s.n.m. supera los 13 millones de cabezas. Estos animales fueron introducidos a la llegada de los colonos españoles hace más de 500 años, por lo que se podría suponer que debiesen estar adaptados a tales condiciones ambientales. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de generaciones que lleva el ganado ovino habitando en estas condiciones, las peculiaridades de este ambiente siguen teniendo efectos detrimentales sobre su producción y reproducción.

Como respuesta a esta problemática es que se han llevado a cabo diversos estudios e investigaciones en torno al mecanismo por el cual la hipoxia hipobárica y el estrés oxidativo generan baja fertilidad, restricciones en el desarrollo intrauterino y bajos pesos de las crías al nacimiento; como a su vez la forma en que la suplementación de estos animales con vitaminas C y E en periodos de monta y gestación previenen estos efectos. Sin embargo, no se tiene claro si la baja fertilidad observada en ovejas sometidas a hipoxia hipobárica y estrés oxidativo, secundario a la hipoxemia, tenga relación con alteraciones en la dotación folicular de los ovarios.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Desarrollo y dinámica folicular:

La dotación de ovocitos existente en el ovario de cualquier hembra mamífera queda establecida durante el desarrollo fetal. Estos ovocitos forman parte de una estructura llamada folículo ovárico, que permanece estable en su forma primordial hasta que entra en fase de crecimiento, proceso que recibe el nombre de foliculogénesis. En el caso de la oveja, el número total de folículos primordiales alrededor del día 75 de la etapa fetal es cercano al millón y disminuye paulatinamente para no ser superior a los 250.000 al momento de la pubertad (López *et al.*, 2002). Otros autores mencionan 40.000 a 300.000 folículos primordiales en el ovario prepúber, entre 12.000 y 86.000 en el individuo adulto y entre 100 y 400 folículos en crecimiento en cada ciclo, siendo que solamente 10 a 40 son visibles en la superficie ovárica. Así, durante la mayor parte del ciclo estral, cada ovario en la oveja adulta contiene 10 folículos mayores a 2 mm de diámetro, de los cuales las 2/3 cursan atresia (Uribe-Velásquez *et al.*, 2009).

La foliculogénesis se inicia con la entrada de folículos que no se encuentran en fase de crecimiento a la fase de crecimiento, proceso que resulta del balance entre estímulos estimuladores (activina, IGF, EGF, TGF alfa y beta, FGF, GDF 9 y BMP 15) e inhibitorios (inhibina y follistatina) (Philip, 2003), y culmina con la formación de uno o más folículos preovulatorios durante cada ciclo (Gougeon, 2004). Durante el proceso de la foliculogénesis y ovogénesis se encuentra una serie de cambios secuenciales de distintas características, cada uno de ellos necesario para establecer el inicio de una nueva etapa. Los factores que causan que algunos folículos se mantengan en el *pool* de primordiales o que otros se activen y entren en crecimiento son aún desconocidos (López *et al.*, 2002).

Una vez activado el folículo primordial que contiene un oocito, junto al cambio morfológico de las células de la granulosa desde planas a cuboidales y desde una organización unilaminar a multilaminar, se verifica un cambio en la localización de los folículos en el ovario, de forma que aquéllos en reposo están localizados en la zona cortical ovárica (poco vascularizada), mientras que los que están en crecimiento avanzan hacia la

zona córtico-medular (más vascularizada) para terminar en folículos preovulatorios que retornan a la periferia del ovario. En la oveja, el ovocito entra en fase de crecimiento cuando está rodeado de aproximadamente 15 células de la granulosa. El folículo primario contiene una o más capas de células cúbicas de la granulosa; a medida que el folículo va creciendo hasta la aparición del antro, la población de células de la granulosa se multiplica por ocho y el ovocito aumenta tres a cuatro veces su tamaño (López *et al.*, 2002).

Una vez desarrollado el antro folicular, el crecimiento de estos folículos se relaciona con la acción de las gonadotropinas hipofisarias, coincidente con tamaños mayores de 0,5 mm en los que los folículos entran en una fase de crecimiento rápido que puede terminar en atresia o en la ovulación. A partir de los 2 mm de diámetro, en las ovejas, el desarrollo folicular se vuelve completamente dependiente de las gonadotropinas y se inicia el crecimiento terminal. Esta etapa se puede dividir en tres partes principales, siendo la primera el reclutamiento de folículos en un número muy superior a la tasa de ovulación característica, con una duración de aproximadamente un día en la oveja. Luego de ésta, los folículos entran a la selección y dominancia folicular, siendo esta última menos marcada en ovinos que en otras especies. En cada uno de estos periodos más del 99% de los folículos se atresia y sólo uno o unos pocos podrán ovular, dependiendo del momento del ciclo reproductivo en que se encuentre la hembra (López *et al.*, 2002). El proceso continuo de crecimiento y regresión de los folículos pre-ovulatorios es denominado “dinámica folicular”, la que involucra tanto el periodo anterior como posterior a la formación del antro (Uribe-Velásquez *et al.*, 2009).

En las hembras ovinas el crecimiento folicular es un proceso continuo a través del ciclo estral (Uribe-Velásquez *et al.*, 2009), alcanzando la atresia del folículo dominante si se encuentra presente un cuerpo lúteo durante la fase de crecimiento del folículo (López *et al.*, 2002). El patrón de crecimiento folicular en ondas, hace que la dotación de folículos de diversos estadios de maduración se altere a lo largo del ciclo. Entretanto, la duración de la fase luteal determina, en parte, el número de ondas de crecimiento folicular en un ciclo, siendo que ciclos con tres ondas de crecimiento presentan fases luteales más largas que ciclos con dos ondas (Uribe-Velásquez *et al.*, 2009). En el caso de las ovejas, el patrón es

menos definido que en otras especies, pero se mencionan dos a tres ondas por ciclo. Estas ondas emergen alrededor de los días 1 a 2, 7 a 8 y 14 después de la ovulación (Uribe-Velásquez *et al.*, 2009). Algunas de las características más frecuentemente observadas de las ondas foliculares son:

- 1) el folículo mayor de la onda 1 es más grande que el folículo mayor de la onda 2;
- 2) la tasa de crecimiento desde el día de emergencia (primer día con un diámetro de 3 mm) hasta el día de máximo diámetro es de alrededor de 1 mm/día;
- 3) en promedio un total de 1,2 a 1,5 folículos alcanzan cinco o más mm de diámetro en cada onda, pero esto depende de la raza estudiada;
- 4) el intervalo entre la onda 1 y la onda 2 es más largo que entre la onda 2 y la onda 3, y los folículos que no alcanzan más de 3 mm de diámetro emergen y regresionan de un modo más continuo. Se han reportado algunos factores que afectan el número de ondas por ciclo. Durante la transición desde el anestro estacional a la estación reproductiva, los ciclos interovulatorios son más largos o más cortos que lo normal y por tanto, tienen más o menos ondas foliculares, respectivamente (Rubianes, 2000).

El cuerpo lúteo es identificable en todas las hembras ovinas al tercer día del ciclo estral y su diámetro llega hasta de $13,3 \pm 0,6$ mm al quinto día, declinando al día 11, para alcanzar $7,5 \pm 0,3$ mm el día de la ovulación (Uribe-Velásquez *et al.*, 2009).

Control y alteraciones de la foliculogénesis y gametogénesis

Tanto la foliculogénesis como la gametogénesis son modulados por una compleja interacción entre factores que no sólo involucran gonadotropinas y esteroides, sino que también intervienen factores autocrinos y paracrinos, los que determinarán y guiarán la maduración folicular, ovulación y luteinización. Lo que se desconocía eran las funciones fisiológicas y patológicas que involucraban a los radicales libres y el estrés oxidativo en la reproducción. Un ejemplo de esto es que la ovulación es producto de cambios vasculares y una cascada proteolítica, la interacción entre estos procesos es mediada no tan sólo por citoquinas y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), sino que también por radicales libres (Agarwal *et al.*, 2005). Estos radicales libres que tienen funciones

fisiológicas, como segundo mensajero o factor de crecimiento, sin embargo, al desbalancearse y exceder la cantidad requerida pueden transformarse en agentes patológicos (Hensley *et al.*, 2000).

Un radical libre es una molécula que contiene un electrón libre o no apareado en el último orbital. Esta característica hace que estas moléculas tiendan a reaccionar con otras, originando formas más estables. Es así como la reactividad de cada radical libre es inversamente proporcional a la estabilidad de éste como una molécula sola (Riley y Behrman, 1991). La reactividad de estos radicales con distintas moléculas del organismo (ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, carbohidratos, etc.) genera una cascada de reacciones que produce daño celular. El incremento de radicales libres derivados del oxígeno (especies reactivas del oxígeno) por sobre la capacidad antioxidante endógena se conoce como estrés oxidativo (Agarwal *et al.*, 2005).

Existen principalmente dos grupos de radicales libres: las especies reactivas de oxígeno (ERO) y las especies reactivas de nitrógeno. Dentro de las ERO encontramos tres tipos principales: ión hidroxilo (OH^-), radical superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), siendo el ión hidroxilo altamente reactivo (Agarwal *et al.*, 2005).

Fisiológicamente las ERO están involucradas en las funciones reproductivas como son la maduración folicular y ovulación (Behrman *et al.*, 2001), la esteroidogénesis, las funciones del cuerpo lúteo y la luteólisis (Agarwal *et al.*, 2005). El radical superóxido, el peróxido de hidrógeno y los peróxidos de lípidos son generados en el tejido luteal durante su regresión, son estas ERO las que desacoplan el receptor a la LH de la adenil ciclase e inhiben la esteroidogénesis, interrumpiendo la cadena transportadora de colesterol mitocondrial. Por otra parte, las ERO están involucradas también en la reanudación de la meiosis del oocito (Behrman *et al.*, 2001).

Aún cuando la generación de ERO es importante en distintos procesos fisiológicos, éstas pueden también inducir efectos patológicos en el ovario. A medida que los distintos agentes van mutando, el ATP se agota, se induce inflamación y necrosis tisular, y gatillan señales tempranas de apoptosis celular (Behrman *et al.*, 2001). Cuando las ERO alcanzan concentraciones mayores a las fisiológicas en la célula y los antioxidantes, tanto naturales

como sintéticos, no son capaces de contrarrestar su acción, se desencadena una serie de acciones que pueden resumirse en tres categorías diferentes: daño al DNA y RNA, peroxidación lipídica y daño proteico (Riley y Behrman, 1991).

Entre los factores que sostienen un desarrollo óptimo del oocito se encuentran la vascularidad folicular, la concentración de oxígeno intrafolicular y la actividad mitocondrial. El estrés oxidativo induce daño del DNA y gatilla la apoptosis. De hecho, folículos que experimentan hipoxia severa contienen un alto porcentaje de oocitos con anomalías meióticas. Otros estudios han relacionado positivamente las concentraciones de ERO en el fluido folicular y el porcentaje de gestación en mujeres a través de FIV (fecundación in vitro), sin embargo concentraciones suprafisiológicas conducen a estrés oxidativo, el que está implicado como etiología en defectos del desarrollo embrionario (Revelli *et al.*, 2009).

En general, altos niveles de ERO reflejan una amplia gama de condiciones patológicas que afectarán potencialmente la fertilidad (Revelli *et al.*, 2009). Aun cuando la vida media de las ERO es corta, sus interacciones inician eventos que se propagan por sí mismos y son de larga duración (Behrman *et al.*, 2001). Por lo tanto, es importante mantener un equilibrio óptimo entre el oxígeno disponible para el folículo y oocito, y las concentraciones de antioxidantes en el fluido folicular (Revelli *et al.*, 2009).

Altura, estrés oxidativo y fertilidad

La hipoxia puede afectar negativamente la función de los tejidos, en especial de aquellos sensibles a la falta de oxígeno. Las células germinales se encuentran dentro del grupo de las más sensibles a la hipoxia (Carlos *et al.*, 2001).

Las células que viven en ambientes aeróbicos están enfrentadas constantemente a la paradoja del oxígeno (O₂): este es absolutamente necesario para mantener la vida, pero sus metabolitos como los radicales libres de oxígeno pueden no sólo modificar las funciones celulares, sino que también poner en peligro la supervivencia de éstas. Por esto, los diferentes radicales libres tienen que ser continuamente inactivados para tener sólo un pequeño porcentaje necesario para mantener la función celular en su normalidad. El estrés oxidativo

surge como consecuencia ya sea de una excesiva producción de ERO, de un mecanismo antioxidante deficiente o de ambos. Se propone que el exceso de ERO está involucrado en una amplia gama de patologías que afectan la función reproductiva (Agarwal *et al.*, 2003).

Frente a situaciones que comprometen la integridad del individuo, el organismo privilegia las funciones de los órganos vitales como cerebro, corazón, riñón y pulmones por sobre las funciones reproductivas (Simon, 2009). Frente a un ambiente hipóxico hipobárico se observará como respuesta del organismo una redistribución del gasto cardiaco, con aumento del volumen circulatorio dirigido a los órganos vitales como forma de compensar la hipoxia y mejorar el aporte de O₂ a los tejidos (Tejerina, 2007). Este fenómeno no se ha demostrado en los ovarios, donde la concentración de oxígeno intrafolicular es directamente proporcional a la concentración de oxígeno en la arteria ovárica, por lo que la exposición a un ambiente hipóxico lleva a hipoxemia ovárica y folicular (Fraser *et al.*, 1973). Además, la exposición a estas condiciones ambientales, ya sea de forma natural o artificial, incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno, lo que puede resultar en que el individuo caiga en un estado de estrés oxidativo, producto del desbalance entre los radicales libres y los mecanismos que los controlan. Diferentes investigaciones han demostrado el aumento significativo de biomarcadores del daño oxidativo en poblaciones que son expuestas a grandes alturas o hipoxia hipobárica artificial (Parraguez, 2011; Möller *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2004).

Antioxidantes

El efecto deletéreo de las ERO puede ser contrarrestado por secuestradores de radicales libres o por antioxidantes (Revelli *et al.*, 2009). Entre de los antioxidantes encontramos dos grandes grupos: antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos. Dentro de estos últimos se encuentran los naturales y los sintéticos o exógenos. Los antioxidantes sintéticos se conocen también como suplementos dietarios, donde se encuentran las vitaminas C y E, el selenio, zinc, taurina, hipotaurina, glutatión, betacaroteno y caroteno, entre otros (Agarwal *et al.*, 2005).

Diversos estudios han evidenciado que la concentración de antioxidantes en el fluido

folicular es significativamente mayor en folículos con oocitos competentes que aquéllos que no son fertilizables. Esto demuestra una estrecha relación existente entre la presencia de antioxidantes y la fertilidad. Estas concentraciones de antioxidantes en el fluido folicular probablemente reflejan la actividad antioxidante de las células de la granulosa como respuesta a un estrés oxidativo (Revelli *et al.*, 2009).

Se sabe que la exposición de ovejas a la altura disminuye la fertilidad y que la suplementación con vitaminas C y E atenúa estos efectos negativos (Parraguez *et al.*, 2011). La finalidad de este estudio es describir el efecto de la hipoxia y de la suplementación con vitaminas antioxidantes sobre la dotación folicular ovárica de ovejas adaptadas y no adaptadas a la altura, dado que los efectos de la altura son mediados por la hipoxia y el estrés oxidativo secundario a la hipoxia.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de la hipoxia hipobárica y de la suplementación con vitamina E y C, sobre la dotación folicular ovárica presente al día 5 del ciclo estral en ovejas nativas y recién expuestas a la altura (3.600 metros sobre el nivel del mar).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer el efecto de la hipoxia hipobárica sobre los componentes de la dotación folicular ovárica de ovejas nativas y recién expuestas a una altura de 3.600 metros sobre el nivel del mar.
2. Establecer el efecto de la terapia antioxidante sobre los componentes de la dotación folicular ovárica de ovejas nativas y recién expuestas a una altura de 3.600 metros sobre el nivel del mar.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Se utilizaron ovarios de ovejas mestizas obtenidos de otras investigaciones realizadas en la Estación Experimental del Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS) de la Universidad de Chile, a una altura de 3600 m.s.n.m. y en la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, a una altura de 580 m.s.n.m. Estas ovejas fueron sincronizadas utilizando dos dosis de 125 µg Cloprostenol intramuscular, separados por 9 días. Los ovarios se extrajeron el día 5 del tercer ciclo estral postratamiento de sincronización. Los grupos de ovejas de los cuales fueron obtenidos los ovarios son los siguientes:

- Ovejas nativas de la altura sin suplementación vitamínica (HH)
- Ovejas nativas de la altura suplementadas con vitaminas C y E (HH-V)
- Ovejas nativas del Valle de Lluta; región de Arica, Parinacota; sin suplementación vitamínica (LL)
- Ovejas nativas del Valle de Lluta; región de Arica, Parinacota; con suplementación de vitaminas C y E (LL-V)
- Ovejas nativas del Valle de Lluta; región de Arica, Parinacota; llevadas a la altura sin suplementación vitamínica (LH)
- Ovejas nativas del Valle de Lluta; región de Arica, Parinacota; llevadas a la altura con suplementación de vitaminas C y E (LH-V)

Cada uno de los grupos anteriormente mencionados contó con cinco ovejas.

Los ovarios fueron obtenidos mediante laparoscopia, en las ovejas anestesiadas utilizando ketamina 20 mg/kg intramuscular por animal. Para asegurar que los folículos se encontraban en la etapa deseada, previo a la ovariectomía, el desarrollo folicular fue seguido por ecografías diarias, utilizando un ecógrafo en tiempo real (Aloka SSD-500, Japón) y un transductor lineal transrectal de 7,5 MHz (Aloka UST-600-7,5, Japón).

Los ovarios fueron fijados en paraformaldehído 4% en buffer fosfato e incluidos en parafina. Se prepararon cortes de los ovarios con un grosor de 6 μm utilizando un micrótomo. Los cortes de los ovarios fueron dispuestos en portaobjetos donde se procesaron para histología corriente y teñidos con hematoxilina-eosina.

El reconocimiento y recuento de las estructuras foliculares se realizó mediante un microscopio óptico acoplado a un sistema computacional de captura de imágenes. Se obtuvieron imágenes de dos cortes sagitales, consecutivos, obtenidos de la zona media de los ovarios. Las imágenes fueron capturadas utilizando aumentos de 2,5X, 4X y 10X. Los primeros dos aumentos fueron utilizados para el recuento de los folículos preovulatorios, los folículos atresicos y cuerpos lúteos en toda la corteza de cada sección de ovario, mientras que el recuento de los folículos primarios y en crecimiento se llevó a cabo utilizando el aumento de 10X en 4 campos microscópicos, distribuidos de forma aleatoria sobre la corteza de cada sección de ovario.

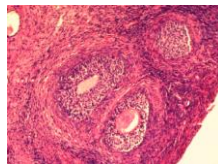
Una vez obtenidas las imágenes se clasificaron las estructuras encontradas en folículos primordiales y folículos en crecimiento, para posteriormente determinar su frecuencia para cada estructura, de acuerdo a procedimientos de estereoscopía (Charleston *et al.*, 2007). Para clasificar los estadios foliculares existentes se utilizaron las siguientes definiciones (Di Fiore, 2008):

- Folículo primordial: está formado por el oocito primario más una capa simple de



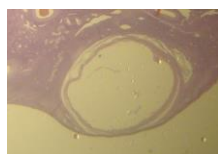
células foliculares aplanadas, ocupando la zona superficial del estroma ovárico.

- Folículo en crecimiento: abarca desde los folículos con una capa unilaminar de



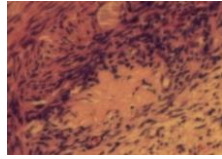
células foliculares cúbicas, hasta folículos con capas multilaminares con comienzos de aparición del antro.

- Folículo preovulatorio: es el folículo maduro que cuenta con una cavidad antral

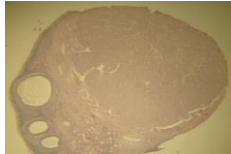


completamente desarrollado y que hace prominencia en la superficie del ovario. En este punto llamado estigma, la túnica albugínea y la teca folicular se adelgazan.

- Folículo atrésico: los hay en distintos grados y es todo aquel folículo que presenta un aspecto atípico.



- Cuerpo lúteo: estructura que está rodeada por una membrana fibrosa que está constituida por una franja amplia de epitelio glandular de recorrido ondulado, cuyas células secretoras están dispuestas en cordones o trabéculas anastomosadas entre sí. La posición central está ocupada por tejido conectivo laxo que engloba un pequeño coágulo sanguíneo.



Análisis estadístico

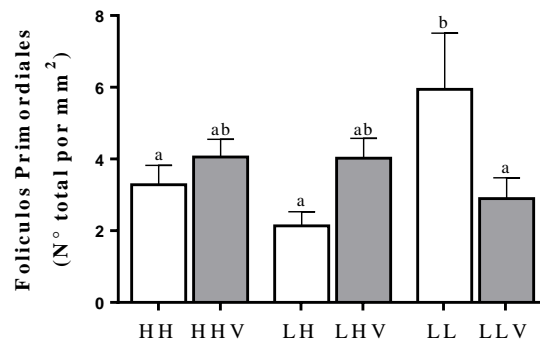
Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de diseño factorial, donde se probaron los efectos de la altura de origen y altura donde ciclan las ovejas, así como el efecto de la administración de antioxidantes y las interacciones entre los distintos factores. Cuando se obtuvieron diferencias significativas, se realizó la prueba *post hoc* de Duncan para establecer cuáles son los grupos diferentes. Se consideraron diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Al observar los recuentos para los folículos primordiales (figura N°1) se observa que el grupo que obtuvo valores significativamente más altos fue LL, con un promedio de $5,9 \pm 0,2$ folículos primordiales/mm² y los más bajos HH y LH con promedios de $3,3 \pm 0,04$ y $2,1 \pm 0,03$ folículos primordiales/mm², respectivamente. Los otros grupos obtuvieron valores intermedios.

Figura N°1

Frecuencia de presentación de Folículos Primordiales en ovarios al día 5 del ciclo, en ovejas expuestas a hipoxia hipobárica de forma aguda o crónica y ovejas mantenidas al nivel del mar, con y sin administración de vitaminas C y E.



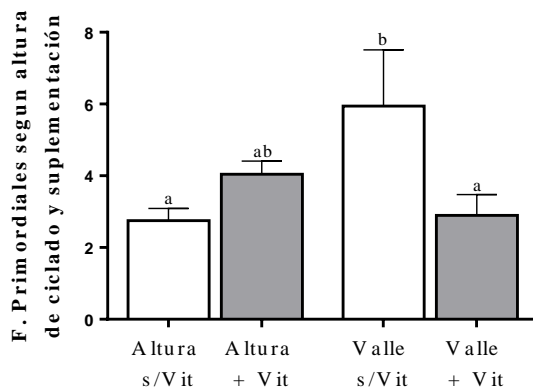
Las diferentes letras sobre las columnas indican una diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,05$, prueba de Duncan).

Al analizar con mayor detalle los datos obtenidos podemos apreciar una interacción entre la altura donde ciclaron las ovejas y la administración de vitaminas antioxidantes ($p = 0,003$), lo que quiere decir que el resultado de la administración de vitaminas C y E varía dependiendo de la altura a la cual cicla la oveja. Esto se ha graficado con mayor claridad en la figura N°2 donde se han dividido los grupos en lugar donde ciclaron (altura o valle) y en los que recibieron o no suplementación con vitaminas C y E. Aquí se puede apreciar como las ovejas que ciclaron en el valle sin suplementación vitamínica (LL) fueron las que obtuvieron recuentos más altos (con aproximadamente $5,9 \pm 0,2$ folículos primordiales/mm²) mientras que las que ciclaron en altura sin suplementación vitamínica ($2,7 \pm 0,02$ folículos primordiales/mm²) y las que permanecen ciclando en el valle pero

recibieron suplementación vitamínica ($2,9 \pm 0,09$ folículos/mm²) son las que obtienen recuentos significativamente inferiores. Las ovejas que ciclaron en altura y recibieron suplementación vitamínica mostraron un comportamiento intermedio a los otros grupos.

Figura N°2

Frecuencia de presentación de Folículos Primordiales en ovarios al día 5 del ciclo: efecto de la altura a la cual ciclaron las ovejas y de la suplementación con vitaminas C y E.

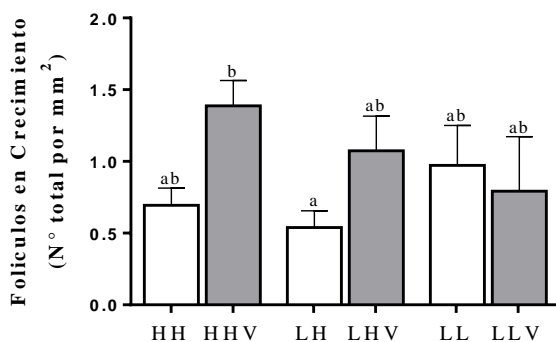


Las diferentes letras sobre las columnas indican una diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,05$, prueba de Duncan).

En cuanto a los folículos en crecimiento, al comparar los grupos (figura N°3) se distingue al grupo HHV que tuvo el recuento de folículos primordiales más alto con un promedio de $1,4 \pm 0,007$ folículos en crecimiento/mm², en tanto que el valor más bajo correspondió al grupo LH con un promedio de $0,5 \pm 0,009$ folículos en crecimiento/mm². El resto de los grupos mostró un comportamiento intermedio. Además, aun cuando no es significativo, para ambas formas de exposición a la hipoxia, se puede apreciar como la administración de vitaminas incrementa el promedio de folículos en crecimiento.

Figura N°3

Frecuencia de presentación de Folículos en Crecimiento en ovarios al día 5 del ciclo, en ovejas expuestas a hipoxia hipobárica de forma aguda o crónica y ovejas mantenidas al nivel del mar, con y sin administración de vitaminas C y E.

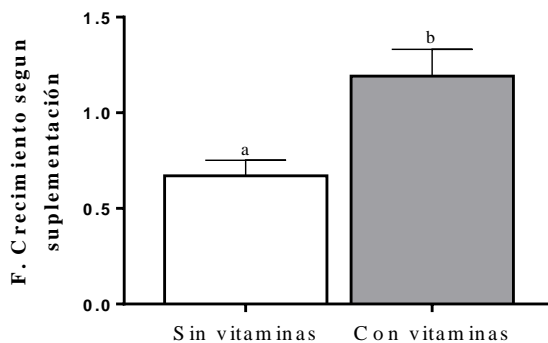


Las diferentes letras sobre las columnas indican una diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,05$, prueba de Duncan).

Solo en este estadio folicular la administración de vitaminas C y E demostró un efecto significativo por sí sola ($p = 0,002$; figura N°4) mostrando que, en promedio, los que recibieron suplementación vitamínica presentaron significativamente más folículos en crecimiento/mm² que los que no recibieron, siendo $1,2 \pm 0,007$ folículos en crecimiento/mm² para los con suplementación de vitaminas C y E y $0,7 \pm 0,003$ para los que no recibieron vitaminas.

Figura N°4

Frecuencia de presentación de folículos en crecimiento en ovejas mantenidas en la altura o a nivel del mar: efecto de la suplementación con vitaminas C y E.

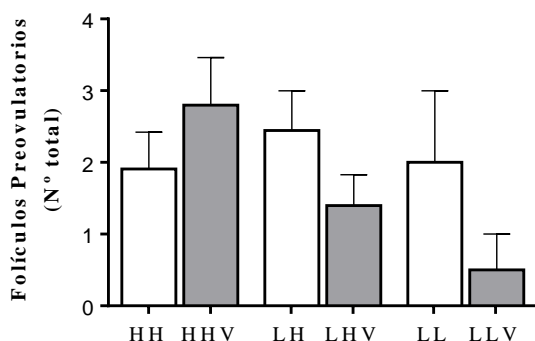


Las diferentes letras sobre las columnas indican una diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,05$).

El estudio no reveló diferencias significativas entre los grupos para con el recuento de folículos preovulatorios, obteniendo promedios de $1,9 \pm 0,51$; $2,8 \pm 0,66$; $2,5 \pm 0,56$; $1,2 \pm 0,43$; 2 ± 1 y $0,5 \pm 0,5$ folículos preovulatorios para HH, HHV, LH, LHV, LL y LLV respectivamente (figura N°5).

Figura N°5

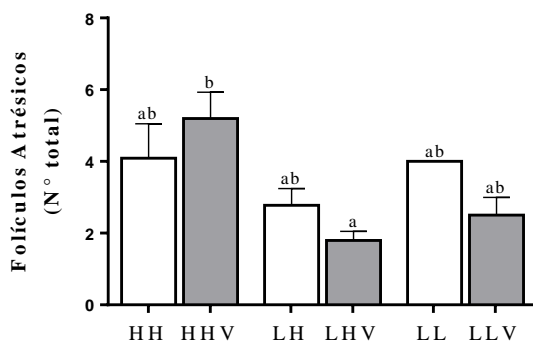
Frecuencia de presentación de Folículos preovulatorios en ovarios al día 5 del ciclo, en ovejas expuestas a hipoxia hipobárica de forma aguda o crónica y ovejas mantenidas al nivel del mar, con y sin administración de vitaminas C y E.



El grupo que presentó significativamente el mayor recuento de folículos atrésicos fue HHV, con un promedio de $5,2 \pm 0,73$ folículos atrésicos, mientras que el más bajo fue LHV con un promedio de $1,8 \pm 0,25$ folículos atrésicos (figura N°6). El resto de los grupos demostró un comportamiento intermedio a estos dos valores.

Figura N°6

Frecuencia de presentación de Folículos Atrésicos en ovarios al día 5 del ciclo, en ovejas expuestas a hipoxia hipobárica de forma aguda o crónica y ovejas mantenidas al nivel del mar, con y sin administración de vitaminas C y E.

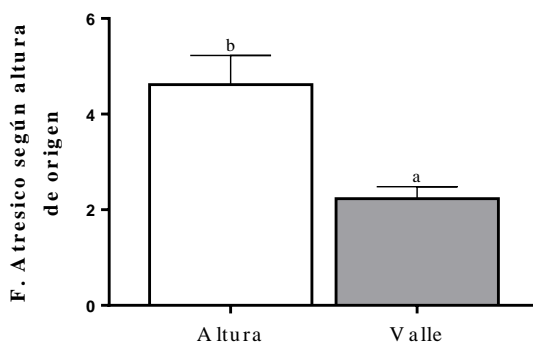


Las diferentes letras sobre las columnas indican una diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,05$, prueba de Duncan).

Al analizar estos datos de acuerdo a cada factor involucrado, pudimos encontrar que la diferencia entre los grupos era atribuible al origen de los animales ($p = 0,001$), siendo los que tenían un origen de altura los que presentaron, en promedio, una frecuencia significativamente mayor, siendo esta de $4,6 \pm 0,61$ folículos atrésicos, mientras que los del valle presentaron en promedio $2,4 \pm 0,25$ (figura N° 7).

Figura N°7

Frecuencia de presentación de Folículos Atrésicos en ovarios al día 5 del ciclo, en ovejas nativas de la altura o del nivel del mar: efecto de la altura donde ciclaron.

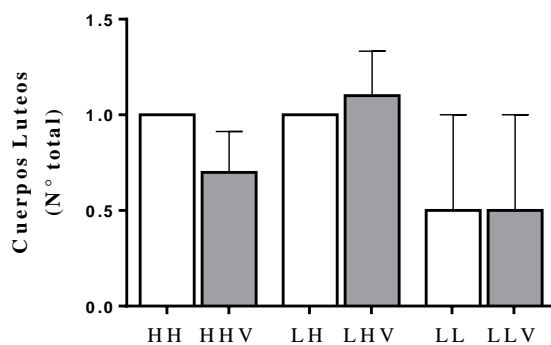


Las diferentes letras sobre las columnas indican una diferencia significativa entre los grupos ($P < 0,05$).

Las frecuencias encontradas para los cuerpos lúteos fueron de 1 ± 0 ; $0,7 \pm 0,27$; 1 ± 0 ; $1,1 \pm 0,23$; $0,5 \pm 0,5$ y $0,5 \pm 0,5$ para HH, HHV, LH, LHV, LL Y LLV, respectivamente; las que no mostraron diferencias significativas entre los grupos (figura N°8).

Figura N°8

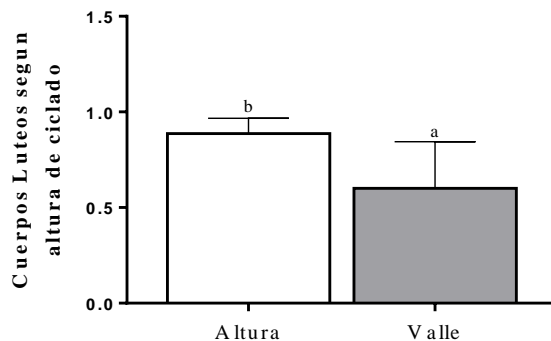
Frecuencia de presentación de Cuerpos Lúteos en ovarios al día 5 del ciclo, en ovejas expuestas a hipoxia hipobárica de forma aguda o crónica y ovejas mantenidas al nivel del mar, con y sin administración de vitaminas C y E.



Al dividir los grupos clasificándolos según la altura a la cual habían ciclado las ovejas se encontró una diferencia significativa ($p= 0,05$). Esto se ve de forma más evidente en la figura N°9, siendo las ovejas que ciclaron en altura ($1 \pm 0,08$ cuerpo lúteo) las que obtuvieron un valor superior a las ovejas que ciclaron en el valle ($0,5 \pm 0,29$ cuerpo lúteo).

Figura N°9

Frecuencia de presentación de Cuerpos Lúteos en ovarios al día 5 del ciclo, en ovejas nativas de la altura o del nivel del mar: efecto de la altura donde ciclaron.



Las diferentes letras sobre las columnas indican una diferencia significativa entre los grupos ($P<0,05$).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el estudio mostraron que los distintos estadios foliculares ováricos de las ovejas tuvieron diferentes recuentos de acuerdo a las condiciones a las que fueron expuestas las ovejas. Los resultados indicaron que la exposición a la hipoxia significó una diferencia en el número de folículos encontrado en relación a lo que presentaron los controles no expuestos (LL y LLV) generando, por una parte, una disminución del recuento en el caso de folículos primordiales, en crecimiento y atrésicos, y por otra, un aumento en cuerpos lúteos. El efecto negativo de la hipoxia hipobárica sobre el recuento folicular logró ser disminuido por la administración de vitaminas C y E en algunos estadios del ciclo folicular.

Tanto en la población de folículos primordiales como en la de folículos en crecimiento se pudo apreciar como la hipoxia hipobárica fue capaz de disminuir la densidad de estas poblaciones, siendo más notorio en la población de folículos primordiales donde hubo una mayor diferencia entre las ovejas expuestas a condiciones hipóxicas (tanto las que son expuestas de manera aguda como las nativas de estos ambientes) y las que permanecieron en el valle. En el caso de las poblaciones de folículos en crecimiento, el daño producido por la hipoxia es menos evidente, logrando generar una diferencia significativa sólo para el grupo de ovejas que fueron expuestas de manera aguda, pero al analizar las tendencias de los otros grupos podemos observar que son muy parecidas a las de los folículos primordiales. Esto indica no solo que las ovejas sin suplementación de antioxidantes expuestas a hipoxia hipobárica tienen una menor producción de gametos debido a que su *pool* de folículos primordiales es menor; sino que éstas condiciones también dificultan la entrada de los folículos primordiales en crecimiento y el progreso de estos. La administración de vitaminas logra disminuir en parte el efecto negativo de la hipoxia hipobárica, lo que pone de manifiesto que la dinámica folicular, por lo menos en estadios iniciales, puede verse afectada por el estrés oxidativo. La baja frecuencia de folículos en crecimiento en LH y HH puede asociarse al efecto perjudicial de un ambiente hipóxico sobre las actividades esteroideogénicas de células de la granulosa (Basini *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2005 y Nishimura *et al.*, 2008) lo que impediría un normal desarrollo, crecimiento, derivando en una atresia. Además, al encontrarse las células de la granulosa en

constante mitosis, el material genético de ellas se encuentra mayormente expuesto a agentes nocivos por lo que pudiese ser dañado por la acción de las ERO y gatillarse la apoptosis de estas células resultando en la atrofia del folículo afectado (Riley y Behrman, 1991).

Por otra parte, la tendencia descrita en las poblaciones de folículos primordiales y en crecimiento de disminuir en número producto de la hipoxia hipobárica no se sigue en los folículos preovulatorios. Este resultado no concuerda con lo propuesto por Tsai-Turton y Luderer (2006), quienes demostraron que el estrés oxidativo sí induce apoptosis de los folículos preovulatorios. La diferencia con nuestros resultados podría deberse a que quizás la hipoxia a la que fueron sometidas las ovejas pudo no ser lo suficientemente intensa como para generar un desequilibrio del balance entre ERO y los antioxidantes, con el consecuente estrés oxidativo, como para dañar la dinámica folicular ovárica o, que tal vez, dado al bajo recuento total que obtuvimos de folículos preovulatorios, el tamaño muestral fue bajo para las diferencias esperadas (Morales, 2012). Ahora bien, lo encontrado para la población de folículos preovulatorios podría indicar que, si bien el estrés oxidativo es capaz de alterar algunas poblaciones foliculares, este no altera el resultado final de la dinámica folicular ovárica.

Se ha descrito que el daño oxidativo de la vía de síntesis del estradiol podría generar apoptosis y atresia folicular (Lund *et al.*, 1999), por lo que debiesen encontrarse mayor número de folículos atrésicos en ovarios de ovejas expuestas a hipoxia y estrés oxidativo. En nuestros resultados los grupos expuestos a hipoxia y los que permanecieron en el valle no presentaron diferencias significativas. El mayor número de folículos atrésicos fue encontrado en el grupo HHV que a su vez era el grupo con mayor número de folículos en crecimiento. El grupo que obtuvo el recuento de folículos atrésicos más bajo fue LHV, sin embargo ello no puede ser asociado exclusivamente a la administración de vitaminas antioxidantes, sino que a un efecto conjunto de las variables (altura de origen, altura de ciclo y suplementación vitamínica). Este resultado fue sorprendente ya que se esperaba que las ovejas con exposición aguda a la hipoxia (LH) serían mayormente afectadas al no estar ambientadas y presentarían una mayor atresia. Sin embargo, HHV fue el grupo con mayor población de folículos en crecimiento y por lo tanto más folículos con riesgo de daño. Si

separamos los grupos solamente por el lugar de origen (Figura N°7), se observa que la población de folículos atrésicos es mayor cuando la oveja es originaria del ambiente de altura, esto podría relacionarse a lo descrito por (Lund *et al.*, 1999) que nos propone que al llevar estas ovejas más tiempo expuestas a estas condiciones, sus folículos se ha llevado a cabo apoptosis por más tiempo y por eso encontraríamos más folículos atrésicos, habiendo sido incapaces, al parecer, de adaptarse estas ovejas (en relación a su fertilidad) a la altura.

Al igual que los resultados que obtuvimos para las poblaciones de folículos preovulatorios. Las poblaciones de cuerpos lúteos no mostraron diferencia significativa entre los distintos grupos de estudios (figura N°8), pero al agruparlos solamente por el lugar en donde estas ovejas ciclaron (altura o en el valle) se encontró que las que ciclaron en altura presentaban poblaciones significativamente mayores de cuerpos lúteos que las que ciclaron en el valle (LL y LLV). Ello nos indicaría que las ovejas expuestas a condiciones de hipoxia no ven afectado el resultado final de su dinámica folicular. Sin embargo, este resultado y el de los folículos preovulatorios podría deberse también a que a diferencia de las poblaciones de los otros estadios, los recuentos encontrados para estos son tan bajos que se necesita un número poblacional mayor para poder mostrar alguna diferencia (Morales, 2012).

Respeto de la administración de vitaminas, el estudio solo arrojó una diferencia significativa para el recuento de folículos en crecimiento. Existe una tendencia en la que todos los grupos que recibieron vitaminas C y E junto con el grupo control (LL) presentaron recuentos mayores de estos folículos. Esto podría explicarse por la alta actividad mitótica en la que se ven envueltos los folículos en crecimiento, lo que deja expuesto el material genético de las distintas células que los conforman, haciéndolos más sensibles al daño de las ERO y, por lo mismo, se puede apreciar mejor un efecto de las vitaminas antioxidantes.

Por último, aun cuando no haya diferencia significativa, es importante destacar el hecho de que en todos los estadios foliculares los recuentos encontrados en el grupo LLV fueron menores que los encontrados en LL. Esta tendencia podría deberse a que las ovejas que no están expuestas a hipoxia hipobárica y por lo tanto a estrés oxidativo y se les administra

vitaminas E y C sin que sean requeridas cursan con un exceso de vitaminas antioxidantes en su sistema, lo que bloquea la reanudación de la meiosis y la maduración folicular (Behrman, 2001).

CONCLUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran que existe un efecto negativo de la hipoxia hipobárica y el estrés oxidativo secundario a la hipoxia sobre la dinámica folicular. Además, se pudo evidenciar, en el caso de los folículos primordiales y en crecimiento, un efecto positivo de las vitaminas C y E, que lograría disminuir el daño provocado por el estrés oxidativo, no así para folículos preovulatorios y cuerpo lúteo, por lo que se podría especular que el daño que provoca la hipoxia hipobárica en estos últimos estadios no sería a través de daño oxidativo.

Por otra parte, el no haber encontrado cambios significativos en el recuento de folículos preovulatorios no permite asegurar que el daño de la hipoxia hipobárica sobre la dinámica folicular sea responsable de una menor fertilidad en las ovejas, ya que aun cuando existen alteraciones en algunas poblaciones foliculares, no hay evidencia cierta de efectos sobre el resultado final de esta, puesto que el número de folículos preovulatorios y por lo tanto el riesgo a ovular y preñarse no es diferente en ovejas expuestas o no expuestas a las distintas variables.

Finalmente, en este estudio se observó que la administración de vitaminas antioxidantes en hembras que no la requieren por encontrarse en normoxia, podría tener un efecto perjudicial sobre la dinámica folicular, impidiendo eventualmente la reanudación de la meiosis y la maduración folicular, como ha sido previamente descrito por otros autores.

BIBLIOGRAFÍA

- **AGARWAL, A.; SALEH, R.; BEDAIWY, M.** 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fert. Steril.* 79: 829-843.
- **AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.** 2005. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocr.* 3:28.
- **ATTARAN, M.; PASQUALOTTO, E.; FALCONE, T.; GOLDBERG, J.; MILLER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.** 2000. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. [en línea]. <<http://www.clevelandclinic.org/reproductiveresearchcenter/docs/agradoc88.pdf>> [consulta: 1-10-12]
- **BASINI, G.; BIANCO, F.; GRASSELLI, F.; TIRELLI, M.; BOSSOLOATI, S.; TAMANINI, C.** 2004. The effects of reduced oxygen tension on swine granulosa cell. *Regul. Pept.* 120: 69-75.
- **BEHRMAN, H.; KODAMAN, P.; PRESTON, S.; GAO, S.** 2001. Oxidative stress and the ovary. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 8: 40-42.
- **CARLOS, S.; BOLADOS, A.; CONTRERAS, G.** 2007. Estudio de opinión en ginecólogos del norte de Chile: problemas de fertilidad en altitud. *Cienc. Trab.* 9: 35-38.
- **CHARLESTON, J.; HANSEN, K.; THYER, A.; CHARLESTON, L.; GOUGEON, A.; SIEBERT, J.; SOULES, M.; KLEIN, N.** 2007. Estimating human ovarian growing follicle number: the application of modern stereology techniques to an old problem. *Human Reprod.* 22: 2103-2110.
- **DI FIORE, M.** 2008. Atlas de Histología Normal. 7ª edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, Argentina. pp 167-173.
- **FRASER, S.; RASER, D.; BAIRD, T.; COCKBURN, F.** 1973. Ovarian venous blood PO₂, PCO₂, and pH in women. *J. Reprod. Fert.* 33: 11-17.
- **GOUGEON, A.** 2004. Dynamics of human follicular growth: morphologic, dynamic, and functional aspects. **In:** Leung, P; Adashi, E. *The Ovary*. Segunda edición. Elsevier Academic Press. San Diego, USA. pp 25-43.
- **GUYTON, A.; HALL, J.** 2001. Fisiología de la aviación, las grandes alturas y el espacio. **In:** Tratado de fisiología médica. Décima edición. Editorial Elsevier Saunders. México DF, México. pp 601-609.
- **HENSLEY, K.; ROBINSON, K.; GABIITA, S.; SALSAMAN, S.; FLOYD, R.** 2000. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Rad. Biol. Med.* 28: 1456-1462.
- **LÓPEZ, A.; GONZÁLEZ, A.; SANTIAGO, J.; GÓMEZ, A.** 2002. Dinámica folicular en pequeños rumiantes, [en línea]. <<http://www.exopol.com/seoc/docs/ao0kyoed.pdf>>. [consulta: 04-08-1012]
- **LUND, S.; MURDOCH, J.; VAN KIRK, E.; MURDOCH, W.** 1999. Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function. *Biol. Reprod.* 61: 388-392.
- **MAGALHÃES, J.; ASCENSÃO, A.; VISCOR, G.; SOARES, J.; OLIVEIRA, J.; MARQUES, F.; DUARTE, J.** 2004. Oxidative stress in human during and after 4

hours of hypoxia at a simulated altitude of 5500 m. *Aviat. Space Environ. Med.* 75: 16-22.

- **MÖLLER, P.; RISOM, L.; LUNDBY, C.; MIKKELSEN, L.; LOFT, S.** 2008. Hypoxia and oxidization levels of DNA and lipids in humans and animal experimental models. *IUBMB Life* 60: 707-723.
- **MORALES, P.** 2012. Tamaño necesario de la muestra: ¿cuántos sujetos necesitamos?. Madrid, España. Universidad Pontificia Comillas. pp 4-5.
- **NISHIMURA, R.; KOMIYAMA, J.; TASAKI, Y.; ACOSTA, T.; AKUDA, K.** 2008. Hipoxia promotes luteal cell death in bovine corpus luteum. *Biol. Reprod.* 78: 529-536.
- **PARRAGUEZ, V.H.** 2011. Reproducción en la altura y la paradoja del oxígeno. **In:** Congreso ANEVET, Santiago, Chile. 30 de Septiembre – 1 de Octubre, 2011.
- **PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, .M; ARANEDA, O.; GARCÍA, C.; MUÑOZ, A.; DE LOS REYES, M.; URQUIETA, B.** 2011. Effects of antioxidant vitamins on newborn and placental traits in gestations at high altitude: comparative study in high and low altitude native sheep. *Reprod. Fertil. Dev.* 23: 285-96.
- **PHILIP, G.** 2003, Factores correguladores del crecimiento y diferenciación folicular independiente de gonadotropinas. [en línea]. <<http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3397/Articulos-otros-temas-archivo/Factores-correguladores-del-crecimiento-y-diferenciacion-folicular-independiente-de-gonadotropinas.html>> [consulta: 15-08-2014]
- **REVELLI, A.; DELLE PIANE, L.; CASANO, S.; MOLINARI, E.; MASSOBRIO, M.; RIANAUDO, P.** 2009. Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics. *Reprod. Biol. Endocr.* 7: 40.
- **RILEY, J.; BEHRMAN, H.** 1991. Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.* 198: 781-791.
- **RUBIANES, E.** 2000. Avances en el conocimiento de la fisiología ovárica de los pequeños rumiantes y su aplicación para el manejo reproductivo. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Depto. de Fisiología. 93-103 p.
- **SIMON, H.** 2009. Stress – the body's response. [en línea]. <http://www.umm.edu/patiented/articles/what_biological_effects_of_acute_stress_000031_2.htm> [consulta: 19-10-12]
- **TEJERINA, H.** 2007. Asfixia neonatal. [en línea]. <<http://www.scielo.org.bo/pdf/rbp/v46n2/v46n2a12.pdf>> [consulta: 10-06-2012]
- **THOMAS, P.; RAHMAN, S.; KUMMER, J.; KHAN, I.** 2005. Neuroendocrine changes associated with reproductive dysfunction in Atlantic croaker after exposure to hypoxia. *Soc. Environ. Toxicol. Chem. Baltimore, MD*, p. 59.
- **URIBE-VELÁSQUEZ, L.; CORREA-OROZCO, A; OSORIO, J.** 2009. Características del crecimiento folicular ovárico durante el ciclo estral en ovejas. *Biosalud* 8: 117-131.