

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



**EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE VITAMINAS
ANTIOXIDANTES EN LA GAMETOGÉNESIS Y EL
ESTATUS REDOX DEL SEMEN EN CARNEROS
EXPUESTOS A LA ALTURA**

OSCAR ESTEBAN FUENTES MOLINA

Proyecto de Tesis para optar al
Título Profesional de Médico Veterinario
y al Grado Académico de Magíster
en Ciencias Animales y Veterinarias

PROFESOR GUÍA: DR. VICTOR HUGO PARRAGUEZ

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1130181

Santiago - Chile

2019

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



**EFFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE VITAMINAS
ANTIOXIDANTES EN LA GAMETOGÉNESIS Y EL
ESTATUS REDOX DEL SEMEN EN CARNEROS
EXPUESTOS A LA ALTURA**

OSCAR ESTEBAN FUENTES MOLINA

Proyecto de Tesis para optar al
Título Profesional de Médico Veterinario
y al Grado Académico de Magíster
en Ciencias Animales y Veterinarias

PROFESOR GUÍA: DR. VICTOR HUGO PARRAGUEZ

Financiamiento: Proyecto FONDECYT 1130181

Santiago - Chile

2019

BIOGRAFÍA

Oscar Fuentes Molina nació en la ciudad de Santiago el 6 de Enero de 1990. Cursó sus estudios primarios y secundarios en el colegio Compañía de María Seminario. Desde temprana edad manifestó pasión e interés con todo lo relacionado con el mundo animal lo que finalmente lo lleva a ingresar el año 2008 a estudiar la carrera de Medicina Veterinaria en la Universidad de Chile.

Su constante inquietud e interés por explorar diversas áreas de la medicina veterinaria lo lleva a fundar, en conjunto con otros compañeros, el año 2012 la organización “Colaboradores por el Bienestar Animal” (COPBA). Organización que mediante la formación de prácticas y manejos en terreno colabora con los cuidados preventivos de las diversas especies presentes en la granja aledaña a la facultad incursionando en áreas de la carrera que se encuentran escasamente desarrolladas en la formación de los estudiantes de nuestra facultad.

El año 2014 motivado por profundizar y darle continuidad a sus estudios decide ingresar al programa de magíster de Ciencias Animales y Veterinarias.

Mientras cursa sus estudios de posgrado, decide en conjunto con un compañero del magíster postular a un fondo concursable el trabajo gestionado durante el curso de posgrado “Formulación de Proyectos” (dirigido por el Dr. Mario Maino). Luego de adjudicarse el fondo fundan la organización “Central de Apoyo Educativo e Investigación Apícola” CEIAP U-Chile. Organización que se preocupa de fomentar el desarrollo de la apicultura y la sanidad apícola.

Finalmente, el 15 de marzo del año 2019, Oscar se titula como medico veterinario y obtiene el grado académico de magister en Ciencias Animales y Veterinarias en la misma universidad.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por permitirme estudiar la carrera que anhelaba, por el apoyo y comprensión durante la realización de esta tesis y toda mi formación profesional. Por el cariño dado y su esfuerzo en criarnos y educarnos.

A las personas que me ayudaron en la realización de esta tesis: Dr. Parraguez y Dra. Narbona. Al Dr. Victor Hugo Parraguez por recibirme en su laboratorio, por su compromiso con mi trabajo en el diseño y desarrollo de todas las etapas de esta tesis de magister. Y a la Dra. Eileen Narbona por sus sugerencias, sus observaciones críticas y por su tremenda disposición para ayudar en el desarrollo de mi trabajo.

Al área de veterinaria de los trabajos voluntarios fech por todas las experiencias compartidas, por el aprendizaje en conjunto, el compañerismo y ser un ejemplo para todo el resto de las áreas participantes en los ttvv de cómo se debe trabajar, tanto desde un punto de vista anímico como lo profesional.

A los chiquillos de las ONGs Colaboradores por el Bienestar Animal (COPBA) y Centro de Apoyo Educativo e Investigación Apícola (CEIAP) por acompañarme y apañarme en esta aventura de explorar áreas poco desarrolladas dentro de lo que es la malla normal de nuestra carrera, por el aprendizaje permanente, por compartir experiencias, por compartir un sueño y poner todos sus esfuerzos en llevarlo a cabo.

Agradecimientos a google.traductor por ayudarme con mi precario nivel de inglés en la traducción de una amplia variedad de publicaciones científicas necesarias para este estudio.

Agradecimientos a sci-hub.org por poner a disposición los papers para este trabajo y permitir el acceso al conocimiento libre de costos monetarios.

A la facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias (en general), a los profesores, CEV 2011, COPBA, CEIAP y a los amigos que conocí y con los que compartí durante estos años, les doy las gracias por haberme dado una de las mejores etapas de mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	5
2.1. ALTURA E HIPOXIA HIPOBÁRICA	5
2.2. ESTRÉS OXIDATIVO	6
2.2.1. Mecanismos antioxidantes	9
CATALASA	10
GLUTATIÓN PEROXIDASA.....	3
SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	11
2.3. HIPOXIA Y ESTRÉS OXIDATIVO	13
2.3.1. Estrés Oxidativo en el macho y su relación con la fertilidad.....	14
EFECTOS DE LA HIPOXIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL TESTÍCULO ..	14
EFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ESPERMATOZOIDE	15
2.3.2. Anormalidades espermáticas y su relación con el Estrés Oxidativo.	17
2.4. VITAMINAS ANTIOXIDANTES Y SU RELACIÓN CON LA FERTILIDAD	19
VITAMINA E.....	19
VITAMINA C.....	21

3. HIPOTESIS.....	24
4. OBJETIVOS.....	25
4.1. Objetivo General.....	25
4.2. Objetivos Específicos.....	25
5. MATERIALES Y METODOS.....	26
Localización	26
Animales	26
Toma de muestras	27
Extracción y análisis de eyaculados	27
Evaluación de anormalidades espermáticas.....	28
Medición de enzimas antioxidantes y capacidad antioxidante total (TAC) en el plasma seminal	29
Extracción de tejido testicular	30
Análisis histológico del tejido testicular.....	30
Medición de las concentraciones de las vitaminas C y E en la sangre.	31
Análisis Estadístico	32
6. RESULTADOS.....	33
6.1. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la población de espermatogonias presentes en túbulos seminíferos de testículos de carneros.....	33

6.2. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la población de espermatoцитos presentes en túbulos seminíferos de testículos de carneros.....	35
6.3. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la población de espermátidas presentes en túbulos seminíferos de testículos de carneros.....	36
6.4. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la altura del epitelio seminífero de los túbulos seminíferos de testículos de carneros.....	38
6.5. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre el diámetro tubular promedio de túbulos seminíferos de testículos de carneros.....	40
6.6. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la morfología espermática en eyaculados de carneros.	42
6.7. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la actividad de Glutación Peroxidasa (GPx) en el plasma seminal de carneros.....	44
6.8. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) en el plasma seminal de carneros.	45
6.9. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la Capacidad Antioxidante Total (TAC) en el plasma seminal de carneros.....	47
6.10. Efectos la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la concentración de vitamina C en el plasma sanguíneo de carneros.....	48

6.11. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la concentración de vitamina E en el plasma sanguíneo de carneros.	50
7. DISCUSIÓN	52
8. CONCLUSIÓN	62
9. REFERENCIAS	63
Anexo: Certificado de Bioética.....	75

INDICE DE AYUDAS ILUSTRATIVAS

Índice de tablas

Tabla 1. Población de espermatogonias presentes en el túbulo seminífero de testículos de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.....	34
Tabla 2. Población de espermatoцитos presentes en el túbulo seminífero de testículos de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.....	36
Tabla 3. Población de espermátidas presentes en el túbulo seminífero de testículos de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.....	38
Tabla 4. Altura promedio del epitelio seminífero de testículos de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.....	40
Tabla 5. Diámetro tubular promedio de testículos de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.....	42
Tabla 6. Porcentaje de anomalías espermáticas totales en eyaculados de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.....	43
Tabla 7. Actividad de Glutación Peroxidasa en el plasma seminal de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.....	45
Tabla 8. Actividad de Superóxido Dismutasa en el plasma seminal de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.....	46
Tabla 9. Capacidad antioxidante total (TAC) del plasma seminal de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.....	48

Índice de figuras

Figura 1. Concentración de Vitamina C en el plasma sanguíneo de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 60 días.....49

Figura 2. Concentración de Vitamina E en el plasma sanguíneo de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 60 días.....51

RESUMEN

Introducción: La producción ovina es el principal recurso de familias que habitan a gran altura. Sin embargo, presenta una eficiencia reproductiva pobre en relación con lo registrado a nivel del mar. La hipoxia hipobárica propia de ambientes a gran altura produce estrés oxidativo, lo que también produce efectos perjudiciales en el aparato reproductor. Bajas tasas de fertilidad, desarrollo intrauterino y bajos pesos al nacimiento son algunos de los efectos perjudiciales de la gran altura. La terapia antioxidante en ovejas mantenidas en la altura ha mostrado reducir el daño oxidativo causado por la hipoxia e incrementar la capacidad reproductiva. Por esta razón, se evaluó si la suplementación con vitaminas antioxidantes C y E atenúa los efectos perjudiciales del estrés oxidativo causado por hipoxia en la función reproductiva de carneros expuestos a la altura por corto y largo tiempo.

Materiales y Métodos: Se utilizaron carneros nativos y mantenidos a nivel del mar (BB; n=20); nativos del nivel del mar, expuestos a la altura (BA; n=50); nativos de la altura, mantenidos en la altura (AA; n=50). La mitad de los animales de cada grupo fueron suplementados diariamente con 600 mg de vitamina C y 450 UI de vitamina E, vía oral, durante 240 días. Se analizaron las poblaciones celulares presentes en el epitelio seminífero, la morfología espermática en el eyaculado y el estatus antioxidante del plasma seminal.

Resultados: La suplementación con vitaminas evitó y/o amortiguó la reducción de la población de espermatogonias, la reducción de la altura del epitelio seminífero y el diámetro tubular, la disminución de la capacidad antioxidante total y redujo el grado de arresto espermatogénico al día 30 en carneros no adaptados a la altura. Sin embargo, no tuvo efectos sobre la morfología espermática y las enzimas presentes en el plasma seminal de carneros expuestos a gran altura por corto y largo tiempo.

Conclusión: La suplementación con vitaminas antioxidantes favorece la espermatogénesis y la capacidad antioxidante total del plasma seminal de carneros no adaptados a la altura en el corto plazo.

SUMMARY

Introduction: The sheep production is the main resource of families living at high altitude. However, has a poor reproductive efficiency in relation to that recorded at sea level. Hypobaric hypoxia at high altitude environments produces oxidative stress, which leads to detrimental effects on the reproductive system. Low fertility rates, low intrauterine development and low birth weights are some of the damaging effects of exposure to high altitude. Therapy with antioxidant in ewes maintained at high altitude has been shown to reduce oxidative damage caused by hypoxia and increase reproductive capacity. For these reasons, supplementation with antioxidant vitamins C and E was evaluated in its capacity to attenuate the oxidative deleterious effects on reproductive function in rams exposed to high altitude for short or long periods.

Materials and Methods: Three groups of rams were evaluated, rams born and kept at sea level (BB, n = 20); rams born at sea level and exposed to high altitude (BA; n = 50); born and kept at high altitude (AA; n = 50). Half of the animals in each group were daily supplemented with 600 mg of vitamin C and 450 IU of vitamin E, orally, for 240 days. The cell populations present in the seminiferous epithelium, the sperm morphology in the ejaculate and the antioxidant status of seminal plasma were analyzed.

Results: Oral supplementation with vitamins C and E prevented and / or softened the reduction of the spermatogonial population, the reduction of the height of the seminiferous epithelium and the tubular diameter, the decrease of the total antioxidant capacity and reduced the degree of spermatogenic arrest at day 30 in rams not adapted to high altitude. However, it did not have effects on sperm morphology and enzymes present in the seminal plasma of rams exposed at high altitude for a short and long periods.

Conclusion: Supplementation with antioxidant vitamins favors the spermatogenesis and the total antioxidant capacity of the seminal plasma of rams not adapted to high altitude in the short term.

1. INTRODUCCIÓN

La producción ovina es el principal recurso económico de las familias que viven a alturas mayores a los 2500 metros sobre el nivel del mar (msnm), ubicados principalmente en el continente americano y asiático (Huddleston *et al.*, 2003). El ovino es una especie productiva que fue introducida en el altiplano andino hace alrededor de 500 años atrás y, a pesar del tiempo que llevan bajo condiciones de gran altura, su eficiencia reproductiva es pobre en relación a los ovinos que habitan a baja altura (De Carolis, 1987). Además, es frecuentemente utilizado como modelo para estudios de biología humana y medicina (Barry y Anthony, 2008), donde cobra aún más relevancia como modelo de estudio en la altura.

En las crónicas de los conquistadores españoles se hace referencia a que, desde tiempos pasados, la exposición aguda a gran altura podría provocar infertilidad en humanos (González, 2007). También, otros estudios han detectado una infertilidad transitoria en ovinos, ganado vacuno, gatos y conejos que han sido expuestos a gran altura (Monge, 1942; Monge y Mori-Chavez, 1942; Monge *et al.*, 1945).

Se piensa que la reproducción ovina a gran altura se ha mermado por el ambiente de hipoxia hipobárica en la que se desarrolla. Bajas tasas de fertilidad (Parraguez *et al.*, 2006), retardo del desarrollo intrauterino y bajos pesos al nacimiento (Parraguez *et al.*, 2005) son algunos de los efectos perjudiciales de la gran altura. Adicionalmente, se ha observado que la fertilidad de los machos de especies no adaptadas genéticamente a la altura en ambientes de gran altura se reduce en comparación a su contraparte a baja altura (Farías *et al.*, 2005a; Farías *et al.*, 2008; Farías *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2010; Monge *et al.*, 1945; Monge y Mori-Chavez, 1942; Vargas *et al.*, 2011).

La exposición a hipoxia hipobárica, propia del ambiente de altura, produce estrés oxidativo, lo que también produce efectos perjudiciales en diversos tejidos, entre estos el aparato reproductor (Bustos-Obregón *et al.*, 2010).

La terapia con vitaminas antioxidantes ha demostrado reducir el daño oxidativo inducido por hipoxia (Ilavazhagan *et al.*, 2001; Magalhães *et al.*, 2005) y ayuda a prevenir el mal agudo de montaña (Bailey *et al.*, 2001). En estudios realizados en ovejas gestantes sometidas a condiciones de hipoxia hipobárica, se ha demostrado la eficacia de la suplementación con vitaminas antioxidantes en cuanto a mejorar la fertilidad, previniendo los efectos detrimentales causados por el estrés oxidativo y aumentando el peso de las crías nacidas a valores similares a sus pares en baja altura (Parraguez *et al.*, 2011). Sin embargo, sus efectos sobre la fertilidad del macho ovino expuesto a estas condiciones ambientales no han sido descritos.

En este estudio se evaluarán los efectos que genera la exposición a la altura sobre la gametogénesis, el estatus redox del semen y morfología espermática en carneros y la posible prevención de éstos mediante la suplementación con vitaminas antioxidantes C y E.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. ALTURA E HIPOXIA HIPOBÁRICA

La presión atmosférica decrece con la altitud, así como también lo hace la presión parcial de sus componentes (O₂, N₂, CO₂). El oxígeno representa el 21% de los gases atmosféricos. A medida que se incrementa la altura, va disminuyendo la presión parcial de oxígeno ambiental y alveolar, lo que se traduce en efectos fisiológicos donde, tanto la saturación de la hemoglobina como el contenido de oxígeno sanguíneo que contiene y transporta, se ven disminuidos, por lo tanto disminuye el oxígeno que llega a los tejidos (Vargas *et al.*, 2011). Este estrés de origen ambiental a gran altura que genera condiciones de hipoxia fisiológica es lo que se denomina hipoxia hipobárica (HH) (Beall, 2007).

Según el tiempo de exposición a gran altura (sobre 3.000 msnm) la HH puede clasificarse en: crónica (residentes permanentes), aguda (turismo y deportes) o crónica intermitente (por ejemplo, trabajadores mineros) (Farías *et al.*, 2005a).

HH Aguda: Condición en la que los sujetos se exponen a la altura por un corto período (minutos, horas o días).

HH Crónica: Condición que compromete a sujetos que han nacido o que viven permanentemente en altura, por lo que han estado expuestos por períodos prolongados (años) a estas condiciones ambientales.

HH Crónica Intermitente: Condición en la que los sujetos no viven permanentemente en altura, sino que se desplazan por períodos, que pueden tener una duración de horas o días y luego descienden a nivel del mar para su descanso (horas o días), reiterando esta condición por tiempos prolongados.

Esta condición se da frecuentemente en los trabajadores mineros (Richalet *et al.*, 2002).

La HH es una gran preocupación en animales domésticos que no están adaptados genéticamente a la altura, a diferencia de las llamas y las alpacas que presentan una serie de adaptaciones fisiológicas. Además, los animales genéticamente adaptados a la altura no presentan una respuesta vasoconstrictora a la hipoxia, debido a esto, se evita la elevación sostenida de la presión pulmonar arterial y subsecuente hipertrofia ventricular derecha que se puede encontrar en humanos y animales domésticos a gran altura (Moreno *et al.*, 2012).

2.2. ESTRÉS OXIDATIVO

Se ha demostrado que la exposición a gran altura induce estrés oxidativo que va acompañado por una disminución en las concentraciones de glutatión reducido (GSH) y ácido ascórbico (AA) y por un incremento en enzimas antioxidantes como la glutatión reductasa (GR) (Farías *et al.*, 2010). Además, se ha reportado que el estrés oxidativo inducido por la HH está involucrado en alteraciones de la función del aparato reproductor masculino (Vargas *et al.*, 2011).

El estrés oxidativo se produce cuando las especies reactivas de oxígeno (ERO) y otras especies de radicales libres sobrepasan la capacidad de los mecanismos antioxidantes que posee el organismo, lo que puede derivar en un daño celular (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2010).

Las ERO son moléculas que se producen continuamente en el organismo, ya sea como parte del metabolismo celular normal o en respuesta a factores exógenos (Ponce de León, 2014). Las principales especies reactivas de

oxígeno son: anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y los radicales hidroxilos ($\cdot OH$) (Córdova-Izquierdo *et al.*, 2010).

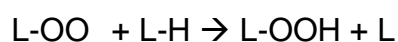
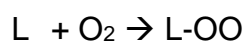
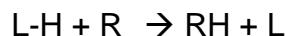
Los radicales libres corresponden a moléculas que tienen por lo menos un electrón desapareado, que les confiere una alta inestabilidad y promueve la transferencia electrónica hacia otras moléculas (Clark *et al.*, 2010). Ellos reaccionan inmediatamente con cualquier sustancia que se encuentre en su área circundante y originan reacciones en cadena que conducen a daño celular (Agarwal y Sekhon, 2010). También poseen importantes funciones fisiológicas como mediadores oxidativos, participando en la fagocitosis, activando enzimas de la membrana celular, disminuyendo la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modificando la membrana, favoreciendo la quimiotaxis, favoreciendo la síntesis de colágeno y prostaglandinas, por lo tanto, se deben considerar beneficiosos o nocivos dependiendo de su concentración y de los mecanismos donde participe (Ponce de León, 2014).

Los mecanismos antioxidantes mantienen un balance entre las ERO generadas y removidas, por lo tanto, una alteración en esta relación puede desembocar en estrés oxidativo, que ocasiona un daño celular que puede modificar la estructura y la función de diversos componentes celulares. El daño celular oxidativo afecta principalmente a proteínas, lípidos y ácido desoxirribonucleico (ADN):

Proteínas: La oxidación de sus aminoácidos conduce a entrecruzamiento en sus cadenas peptídicas y formación de grupos carbonilos (Ponce de León, 2014), lo que conlleva a daños en la integridad de proteínas estructurales, interrupción de la regulación de las vías metabólicas y pérdida de la actividad, si se trata de enzimas (Izquierdo *et al.*, 2009).

Lípidos: Se produce peroxidación lipídica que afecta la función biológica de la membrana, la cual es rica en ácidos grasos poliinsaturados (Ponce de León,

2014), produciéndose alteraciones en su cohesión, fluidez, permeabilidad y función metabólica, pudiendo llevar a apoptosis celular (Izquierdo *et al.*, 2009). La peroxidación lipídica se produce cuando las ERO (R) atacan a un ácido graso poliinsaturado (L-H) y le quitan un átomo de hidrogeno al grupo metileno adyacente al doble enlace, para formar el radical acilácido graso (L). Rápidamente ésta molécula adiciona oxígeno y se transforma en un radical libre, peroxilo ácido graso (L-OO), que actúa como transportador de la reacción en cadena, ya que ataca a otros ácidos grasos poliinsaturados e inicia nuevas reacciones (Córdova *et al.*, 2009). Los productos finales de la peroxidación lipídica son lípidos peroxidados que, al degradarse, generan nuevos radicales libres y una variedad de compuestos citotóxicos, entre estos, 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA), que poseen una elevada capacidad de reaccionar con el ADN, por lo que puede causar lesiones mutagénicas (Echtay *et al.*, 2003; Izquierdo *et al.*, 2009; Ugartondo, 2009).



ADN: El daño oxidativo a este nivel es seguramente el más serio, siendo más afectado el ADN mitocondrial debido a que, por su localización, está expuesto a un flujo constante de ERO provenientes de la cadena respiratoria, además de ser más inestable, ya que carece de histonas. Los radicales libres de oxígeno reaccionan con las bases nitrogenadas y la desoxirribosa fragmentando el ADN, ocasionando con ello problemas en la compactación y enrollamiento de la cromatina, la cual tiene un rol importante en la regulación de la transcripción génica (Izquierdo *et al.*, 2009). Como consecuencia, se provoca mutación de los genes, síntesis de proteínas defectuosas, además de conducir a la apoptosis celular (Sorg, 2004).

2.2.1. Mecanismos antioxidantes

Los antioxidantes funcionan como donadores de electrones, siendo capaces de evitar una cadena de óxido-reducción sacrificando su propia integridad molecular y, por ende, resguardar de alteraciones a moléculas como lípidos, proteínas, ADN, etc. Para proveer el máximo nivel de protección, los antioxidantes intracelulares y extracelulares, se encuentran armónicamente integrados para lograr la máxima supresión de las reacciones generadas por los radicales libres (Izquierdo *et al.*, 2009).

Existen tres tipos de mecanismos antioxidantes: enzimáticos, no enzimáticos y terciarios. Los antioxidantes enzimáticos metabolizan los radicales libres generados durante los procesos metabólicos, los no enzimáticos destruyen directamente los radicales libres generados y los terciarios reparan las biomoléculas que han sido dañadas por los radicales libres (Córdova *et al.*, 2009).

Los mecanismos de defensa antioxidante en el semen incluyen tres niveles de protección: *Prevención*, *Intercepción* y *Reparación*.

Prevención: La primera línea de defensa contra el estrés oxidativo consiste en la prevención de la formación de ERO por encima de los niveles normales del organismo. Por ejemplo, la acción de enzimas peroxidasas uniéndose a iones metálicos, como hierro y cobre, les impide iniciar una reacción en cadena (Saraswat *et al.*, 2014).

Intercepción: Interrumpiendo la reacción en cadena, atrapando las ERO y reduciéndolas, mediante la formación de productos finales no radicales. Por ejemplo, el tocoferol (vitamina E), cumple esta función produciendo radicales

tocoferil durante su oxidación, los cuales pueden ser reducidos en ubiquinona o por ácido ascórbico (vitamina C) (Saraswat *et al.*, 2014).

Reparación: Reparando o eliminando las biomoléculas que han sido dañadas por los radicales libres. Por ejemplo, las enzimas Superóxido Dismutasa (SOD), la Glutación Peroxidasa (GPx), Glutación Reductasa (GR) y Catalasa (CAT) cumplen esta función (Córdova *et al.*, 2009).

El espermatozoide y el plasma seminal, en su conjunto, poseen una abundante actividad antioxidante tanto enzimática (tales como CAT, GPx y SOD) como no-enzimática (Vitamina C y E, glutatión, carnitina y carotenoides), que previenen la acumulación de ERO y preservan la función espermática (Wang *et al.*, 2003; Ross *et al.*, 2010). Cabe destacar que el plasma seminal tiene concentraciones de antioxidantes superiores a la de cualquier otro fluido biológico, incluyendo el suero sanguíneo (Mann, 1964). Además, los antioxidantes presentes en el plasma seminal compensan principalmente la deficiencia en enzimas citoplasmáticas (Angulo *et al.*, 2011). Dentro de los sistemas antioxidantes enzimáticos del plasma seminal se puede encontrar:

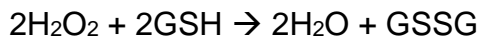
CATALASA

Es una hemoproteína de amplia distribución intracelular, presente en altas concentraciones en riñón e hígado, baja concentración en tejido conectivo y epitelios y nula en tejido nervioso. A nivel celular se localiza en mitocondrias, peroxisomas y en el citosol de los eritrocitos. Esta enzima tiene 2 funciones fundamentales: cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno, proveniente de la dismutación del superóxido, en agua y oxígeno; y cumple un rol peroxidativo y formando parte del sistema antioxidante catalasa/superóxido dismutasa (CAT/SOD) que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Córdova *et al.*, 2009). En su mecanismo de acción, la propia molécula de agua actúa como donante de electrones (Benítez, 2006):

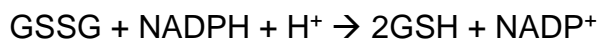


GLUTATIÓN PEROXIDASA

La GPx es una enzima intracelular, selenio dependiente, cuya función antioxidante es un importante mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo (Benítez, 2006). Puede encontrarse en el tejido testicular y espermatozoides de mamíferos (Córdova *et al.*, 2009), incluso en el plasma seminal debido a que es secretada por las vesículas seminales (Zubkova y Robaire, 2004), y realiza un papel estructural en la capsula mitocondrial en la parte media y en el flagelo de los espermatozoides (Córdova *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado su localización en el post-acrosoma y la zona apical de la cabeza del espermatozoide (Marti *et al.*, 2008). Esta enzima utiliza el glutatión reducido (GSH) como donante de electrones, para reducir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua y los lipoperóxidos (L-OOH) a alcoholes de alquilo (L-OH).



El glutatión oxidado (GSSG) resultante es llevado nuevamente a GSH por medio de la enzima GR usando NADPH como co-factor (Benítez, 2006; Gadea *et al.*, 2011).



Si se elevan los niveles de glutatión se tendrá espermatozoides de mejor calidad y mayor viabilidad presentes en el líquido seminal (Gadea *et al.*, 2011; Ponce de León, 2014), por ende, mayor fertilidad.

SUPERÓXIDO DISMUTASA

Las enzimas responsables de la eliminación celular del anión superóxido, las Superóxido Dismutasas, son metaloproteínas que, a través de ciclos de

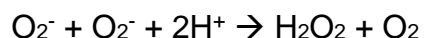
reducción y oxidación de sus metales, aceleran enormemente la desaparición del anión superóxido (González *et al.*, 2002). Se encuentran altamente distribuida en todas las células aeróbicas y su concentración aumenta adaptativamente con la exposición de la célula a gradientes superiores de presión de O₂ (Benítez, 2006). La SOD es secretada por las vesículas seminales para proteger a los espermatozoides después de la eyaculación (Zubkova y Robaire, 2004), y se ha demostrado su localización en el acrosoma, postacrosoma y cola del espermatozoide (Marti *et al.*, 2008). En los organismos eucariotes se expresan 3 tipos de SOD:

A nivel citosólico se localiza la isoforma SOD1, también se puede localizar en el núcleo y en el espacio intermembrana mitocondrial (Milani *et al.*, 2011).

La SOD2 o Mn-SOD, dependiente de Manganeseo, que se localiza en la mitocondria y su función es la detoxificación de O₂⁻ generado por la reducción parcial de O₂ durante la fosforilación oxidativa en la cadena respiratoria.

La SOD3 o SOD extracelular, es una glicoproteína tetramérica dependiente de Cu y Zn, está enzima se ha encontrado en los espacios intersticiales de tejidos y en los fluidos extracelulares (Teoh-Fitzgerald *et al.*, 2012). Además, se ha reportado que presenta una elevada actividad en el plasma seminal en comparación a las otras isoformas de SOD cuya actividad es muy baja (Eghbali *et al.*, 2008). Esta enzima no es inducida por su sustrato u otros oxidantes y su regulación en tejidos de mamíferos son coordinados por citocinas (Teoh-Fitzgerald *et al.*, 2012).

La actividad catalítica de estas enzimas neutraliza la capacidad reactiva del radical superóxido, al reducirlo a peróxido de hidrogeno:



Luego, la reacción continúa hasta la reducción definitiva a agua, por parte de GPx y CAT, del peróxido aquí producido. Esta enzima establece una vigilancia bioquímica, porque el anión superóxido generalmente se forma como un intermediario en las reacciones de oxigenación de sustratos; de esta manera se protegen los tejidos de la acción potencialmente deletérea de este radical libre (Benítez, 2006; Yue *et al.*, 2010).

La SOD, CAT y GPx son los componentes enzimáticos primarios en los mecanismos de defensa contra las ERO. En resultados experimentales, cuando el semen es tratado con las enzimas previamente mencionadas, mejoran la motilidad espermática y la integridad del acrosoma, además de un crecimiento lineal en la sobrevivencia espermática si la concentración de antioxidantes se incrementa (Sarlós *et al.*, 2002).

2.3. HIPOXIA Y ESTRÉS OXIDATIVO

Bajo condiciones hipóxicas, la disminución en la presión parcial de O₂ causa una menor disponibilidad de oxígeno dentro de la célula (Maiti *et al.*, 2006). Debido a que menos O₂ está disponible para ser reducido a H₂O por la citocromo oxidasa, se genera una acumulación de equivalentes reducidos en la cadena transportadora de electrones mitocondrial, provocando la auto-oxidación de uno o más complejos mitocondriales, como por ejemplo la coenzima Q₁₀ con la subsecuente reducción directa de O₂ a superóxido y radicales hidroxilos (Askew, 2002; Kehrer y Lund, 1994; Mohanraj *et al.*, 1998). Estas reacciones conducen a la reducción directa del O₂ hacia superóxido, peróxido y radicales hidroxilo que caracteriza esta situación redox favoreciendo el estrés reductivo que paradójicamente conducen a un incremento de la formación de ERO y una resultante disminución en la habilidad de la célula hipóxica de defenderse a si misma contra el estrés oxidativo (Askew, 2002). Además, el estrés hipóxico

perturba y disminuye la actividad de los sistemas de defensa celular, como las enzimas antioxidantes (Maiti *et al.*, 2006). De este modo, el incremento de ERO durante la hipoxia contribuye al estrés oxidativo total que afecta al organismo (Askew, 2002).

2.3.1. Estrés Oxidativo en el macho y su relación con la fertilidad.

El estrés oxidativo en el aparato reproductor puede originarse por diversas causas tales como tóxicos ambientales, HH, estilo de vida (uso de laptop, wi-fi, teléfonos celulares), patologías tales como criptorquidia, varicocele y diabetes, los cuales se asocian a un aumento de la temperatura testicular (1-2°C) y estrés oxidativo (Moreno *et al.*, 2012). El estrés térmico conduce a un desbalance entre las ERO y los mecanismos antioxidantes (Moreno *et al.*, 2012).

EFFECTOS DE LA HIPOXIA Y EL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL TESTÍCULO

Se han observado cambios locales en los testículos en respuesta a condiciones de HH crónica incluyendo neovascularización, aumento de la temperatura escrotal, disminución del tamaño testicular, disminución de la altura del epitelio seminífero y un aumento del espacio intersticial (Farías *et al.*, 2005b). Las respuestas adaptativas frente a la hipoxia testicular, tales como, vasodilatación y angiogénesis generan un aumento en 1,5°C aproximadamente en la temperatura testicular lo que podría provocar daño espermatogénico (Farías *et al.*, 2005b).

Estudios de tipo morfológicos han revelado que la exposición a HH crónica causa también degeneración del epitelio germinal, plegamiento de la membrana basal, degeneración y separación de las células germinales,

incremento del lumen del túbulo seminífero, sedimentación de gotas lipídicas en las células de Sertoli y un aumento de la lipoperoxidación (Farías *et al.*, 2005a; Liao *et al.*, 2010).

Debido a la gran distancia de difusión de oxígeno que hay desde los vasos sanguíneos a la región luminal de los túbulos seminíferos, es que esta última es considerada hipóxica. La alta actividad proliferativa del epitelio seminífero conlleva un alto consumo de oxígeno. Por lo tanto, la expresión de las enzimas glicolíticas debe estar relacionada a adaptaciones metabólicas a la hipoxia. Muchos eventos reproductivos, tales como capacitación espermática, cambios en la motilidad, reacción acrosómica y fecundación, son dependientes de la glicolisis anaeróbica y ocurren bajo anaerobiosis (Vargas *et al.*, 2011).

EFFECTOS DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL ESPERMATOZOIDE

Una baja en el aporte de oxígeno testicular puede afectar la fertilidad de los machos. Algunos investigadores han sugerido que largos tiempos de hipoxia intratesticular podrían ser parte de la etiología de ciertas fallas espermatogénicas primarias severas (Gat *et al.*, 2010). Se ha observado que la hipoxia crónica induce estados reversibles de oligozoospermia en hombres sanos (Verratti *et al.*, 2008). Sin embargo, si la hipoxia es permanente generara daño isquémico (Gat *et al.*, 2006).

Estudios realizados en ratas macho no adaptadas a condiciones ambientales de HH indican que la hipoxia reduce la fertilidad, reduciendo la motilidad espermática en el semen y el recuento espermático (Farías *et al.*, 2010). Una reducción en el recuento espermático puede estar asociada a un aumento de la apoptosis de las células germinales producto de las condiciones hipóxicas (Farías *et al.*, 2005a; Liao *et al.*, 2010).

Los elevados niveles de ERO producidas después de la migración de los espermatozoides inmaduros desde los túbulos seminíferos al epidídimo pueden

generar daño oxidativo durante su paso por el epidídimo mediante la fragmentación directa o indirecta del ADN y generando daño acrosomal (Ponce de León, 2014). Además, se ha observado que la hipoxia incrementa la descondensación de la cromatina espermática alterando su compactación (Vargas *et al.*, 2011; Hartley *et al.*, 2009).

El semen presenta dos principales fuentes generadoras de ERO: los espermatozoides y los leucocitos presentes en el líquido espermático (Hernández-Matos *et al.*, 2010). En los espermatozoides las ERO son producidas por las mitocondrias, producto de la reducción del oxígeno molecular durante la fosforilación oxidativa (Ponce de León, 2014). Además, los espermatozoides son particularmente sensibles al ataque de ERO debido a la existencia de altas cantidades de ácidos grasos poliinsaturados en sus membranas y a la falta de capacidad para reparar el ADN (Angulo *et al.*, 2011). La actividad anormal de los espermatozoides interviene en la liberación de ERO, peroxidando los ácidos grasos insaturados a fosfolípidos de membrana, produciendo una permeabilización de la membrana plasmática y acrosomal generando poros de membrana que contribuyen a la pérdida en la viabilidad, capacidad fecundante y motilidad del espermatozoide, produciendo simultáneamente un bloqueo en la biosíntesis de ATP, por tanto, reduciendo el aporte energético a la célula.

Por otra parte, la activación de los leucocitos presentes en el fluido seminal produce citoquinas y ERO. Dependiendo de la localización inflamatoria, la duración de la exposición del espermatozoide a los leucocitos y de la capacidad del espermatozoide para activar el sistema inmunológico depende el grado de daño inducido por las ERO (Ponce de León, 2014).

2.3.2. Anormalidades espermáticas y su relación con el Estrés Oxidativo.

Las anormalidades espermáticas pueden clasificarse en primarias y secundarias (Blom y Birch-Anderser, 1965). Las anormalidades primarias son las que ocurren durante el proceso de la espermatogénesis y son atribuibles a daños a nivel del tejido testicular. Dentro de esta clasificación se incluyen los defectos de cabeza y adicionalmente, defectos de pieza intermedia y cola. Las anormalidades secundarias ocurren durante el transporte de los espermatozoides por el epidídimo; dentro de esta clasificación se incluye la presencia de cola doblada, gota citoplasmática proximal y cabeza con acrosoma desprendido (Sorensen, 1991).

La HH inhibe la espermatogénesis en ratas mediante la disminución de espermatoцитos primarios. La apoptosis de espermatoцитos primarios y espermatogonias, inducida por hipoxia, podrían contribuir a la pérdida en esta población de células (Liao *et al.*, 2010).

Otros estudios, han observado un incremento en el porcentaje de espermatozoides anormales en condiciones de HH, donde las anomalías predominantes son malformaciones de cabeza, a diferencia de las anomalías de cola que son más frecuente en condiciones normobáricas (Vargas *et al.*, 2011; Hartley *et al.*, 2009). Las consecuencias del estrés oxidativo ocasionado por la HH contribuirían a la presencia de anormalidades espermáticas.

Se ha descrito que el daño peroxidativo en el espermatozoide humano está asociado con anomalías morfológicas de la pieza media, donde el exceso de citoplasma residual sería localizado (Rao *et al.*, 1989), y la oxidación de la membrana espermática puede dar lugar a una disminución en la fluidez de membrana o daño en las funciones asociadas a membrana, tales como transporte de iones para la regulación del volumen espermático (Yeung *et al.*,

2009). Además, la fragmentación del ADN se correlaciona con defectos en el axonema, anormalidades de cola (Muratori *et al.*, 2000) y una alta frecuencia de gotas citoplasmáticas proximales en el eyaculado (López-Fernández *et al.*, 2008).

Se ha sugerido que la función espermática defectuosa está asociada con defectos en la espermiogénesis que conducen a la liberación de espermatozoides inmaduros desde el epitelio germinal (Gomez *et al.*, 1996).

Cuando un espermatozoide entra en las etapas finales de diferenciación se someten a una transformación por la cual el componente citoplasmático de la célula es removido durante la liberación de la espermátida madura desde la célula de Sertoli (Gomez *et al.*, 1996). El defecto en el mecanismo de expulsión citoplasmática resulta en la liberación de espermatozoides desde el epitelio germinal con un excedente de citoplasma residual. Estos espermatozoides son inmaduros y funcionalmente defectuosos (Makker *et al.*, 2009). Este excedente de citoplasma residual es conocido como gota citoplasmática y la presencia de este defecto está asociado a una función espermática pobre y es indicativo de células espermáticas inmaduras (Cooper, 2005), ésta inmadurez puede estar relacionada con errores en la formación de la cromatina (López-Fernández *et al.*, 2008).

Se ha descrito una asociación entre la incidencia de colas espermáticas deformadas y la posición de la gota citoplasmática. Se ha sugerido que la migración defectuosa de la gota citoplasmática podría estar asociada con la patogénesis del defecto de cola enrollada en el verraco, producto de una espermiogénesis defectuosa probablemente causada por mal funcionamiento del epidídimo (Holt, 1982).

2.4. VITAMINAS ANTIOXIDANTES Y SU RELACIÓN CON LA FERTILIDAD

Los testículos, debido a que son ricos en ácidos grasos poliinsaturados y pobres en defensas antioxidantes, se encuentran mucho más vulnerables al daño por peroxidación que otros tejidos (Jones *et al.*, 1979). El exceso de ERO en el espermatozoide está asociado a deterioro de la función espermática (Wang *et al.*, 2003).

Las moléculas antioxidantes son escasas en las células espermáticas debido a lo pequeño de su citoplasma, en consecuencia, la adición de agentes antioxidantes exógenos puede ser relevante para prevenir el daño oxidativo hipóxico (Vargas *et al.*, 2011).

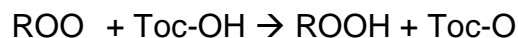
Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas que se oxidan al neutralizar al radical libre y se reponen continuamente mediante la ingestión de nutrientes que los contienen (Ponce de León, 2014). Dentro de estos se puede mencionar:

VITAMINA E

El -tocoferol (vitamina E) es uno de los mejores compuestos antioxidantes conocidos. Debido a que son lipofílicos pueden reducir radicales libres de oxígeno en ambientes hidrofóbicos (Sarlós *et al.*, 2002). Su principal función es proteger la integridad de la bicapa fosfolipídica de la membrana celular y la envoltura mitocondrial mediante la interrupción de la reacción en cadena ocasionada por la lipoperoxidación (Ross *et al.*, 2010), además de fomentar la producción de enzimas antioxidantes eliminadoras de radicales libres, generados durante la reducción univalente de oxígeno molecular y

durante la actividad normal de las enzimas oxidativas (Agarwal y Sekhon, 2010). En las células, la mayoría de la vitamina E se encuentra ubicada en las membranas, adyacente a los ácidos grasos insaturados que son vulnerables al ataque de radicales libres (Rock *et al.*, 1996). Los fosfolípidos de la membrana mitocondrial, plasmática y del retículo endoplasmático poseen alta afinidad para la α -tocoferol (Benítez, 2006).

Su forma biológicamente activa es el α -tocoferol, cuyo hidroxilo fenólico en el anillo cromano es responsable de la reducción antioxidante. Los tocoferoles (Toc-OH) actúan interrumpiendo reacciones de cadena con radicales libres como resultado de su capacidad para transferir el hidrógeno fenólico a un radical peróxido libre (ROO \cdot), quedando a la vez, en la forma de radical libre fenoxi o fenoxilo (Toc-O \cdot), en reacciones intermedias no reversibles que presuponen la transformación de la vitamina hasta su producto final inocuo (Benítez, 2006).



La Vitamina E es importante en la integridad fisiológica de los testículos, epidídimo y glándulas accesorias, lo cual es crítico en la espermatogénesis y en la maduración espermática, por lo tanto mejora la cantidad y calidad de espermatozoides (Yue *et al.*, 2010). El porcentaje de espermatozoides móviles está relacionado con el contenido de α -tocoferol espermático (Rolf *et al.*, 1999). Además, se ha reportado que tiene efectos en la función sexual, regulando la secreción de gonadotropinas en la hipófisis anterior, jugando un rol activo en la promoción de la espermatogénesis y la motilidad espermática (Luo *et al.*, 2004). Por otro lado, se ha descrito que la deficiencia de vitamina E causa degeneración del epitelio germinal (Mason y Mauer, 1975).

Los tratamientos con vitamina E han demostrado que reducen las concentraciones de MDA en el espermatozoide bajo condiciones de normospermia, mejorando la motilidad y la probabilidad de lograr la preñez (Agarwal y Sekhon, 2010) y, en carneros, la suplementación con vitamina E incrementa la producción total de espermatozoides y su concentración (Luo *et al.*, 2004). Adicionalmente, la vitamina E administrada oralmente incrementa significativamente hasta el triple de sus concentraciones plasmáticas en ovejas (Parraguez *et al.*, 2011) y carneros (Cofré-Narbona *et al.*, 2016).

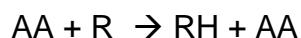
Se ha descrito que la degradación ruminal de la vitamina E es despreciable en dietas de 100% forraje, 50% forraje y altas en concentrados (NRC, 2007).

VITAMINA C

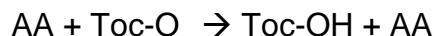
La vitamina C o ácido Ascórbico (AA), es un eliminador de ERO hidrosoluble y tiene el potencial de proteger del daño oxidativo a los componentes citosólicos y de membrana de las células (Farías *et al.*, 2010). El AA está presente en altas concentraciones en el fluido seminal comparado con el plasma sanguíneo (Fraga *et al.*, 1991; Agarwal y Sekhon, 2010), alcanzando en el carnero una concentración promedio de 5 mg/100 ml en el plasma seminal (Mann y Lutwak-Mann, 1981). Se ha demostrado la presencia de AA en las vesículas seminales de carnero, toro, potro y humano (Gonzales, 1989) y la existencia en las células de sertoli de transportadores de vitamina C, tanto de su forma reducida como oxidada, lo que le permite ser entregada de forma regulada a las células germinales en el compartimiento adluminal (Angulo *et al.*, 2011).

Su mecanismo de acción la sitúa en un nivel antioxidante de alta jerarquía, pues incluye la inhibición de la formación de radicales superóxidos o

de nitrosaminas durante la digestión. El AA presenta una configuración de lactona, en la que los grupos hidroxilo asociados al doble enlace funcionan como agentes con un alto potencial reductor, lo que permite incluso, participar en la reducción directa del oxígeno, funcionando así como sustrato donante en las reacciones de las peroxidasas (Benítez, 2006). Este proceso transforma al AA en el radical libre ascorbilo (AA[•]) (Córdoba *et al.*, 2009).



Tiene la capacidad de regenerar otras moléculas antioxidantes, tales como α -tocoferol (Toc-OH), donde actúa como agente reductor de los radicales fenoxilo (Toc-O[•]) formados durante la actividad antioxidante de la vitamina E, restableciéndola (Benítez, 2006). También puede regenerar glutatión y β -caroteno, desde sus respectivas especies radicales oxidadas (Jafaroghli *et al.*, 2014).



El AA protege al espermatozoide del daño oxidativo endógeno neutralizando los radicales hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno y previniendo la aglutinación espermática (Agarwal y Sekhon, 2010). Además, complementa a las enzimas antioxidantes del semen SOD, GPx y CAT, las que son requeridas para una óptima motilidad espermática (Fraga *et al.*, 1991) y se ha demostrado que protege contra el daño oxidativo endógeno del DNA en el espermatozoide humano, reduciendo de este modo los riesgos de defectos genéticos. En muestras de semen que exhiben actividad de ERO, las concentraciones de AA detectadas en el plasma se encuentran reducidas significativamente. Las concentraciones de AA en el plasma seminal están relacionadas positivamente con el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales y por esto se ha sugerido que la Vitamina C es una vitamina protectora del epidídimo (Rolf *et al.*, 1999). Adicionalmente, altas

concentraciones de AA en el plasma sanguíneo se correlacionan con un aumento de la concentración de espermatozoides en el epidídimo y un incremento de las concentraciones de testosterona sérica, lo que indica que la suplementación con AA mejora la calidad del semen (Angulo *et al.*, 2011).

Estudios realizados en ratas macho expuestos a HH intermitente han reportado que la suplementación con AA contrarresta los efectos de la hipoxia sobre el cuerpo, la masa testicular y la masa epididimal; protegiendo contra la lipoperoxidación testicular y epididimal, y preservando el recuento espermático epididimal (Farías *et al.*, 2010).

Aunque la vitamina C administrada oralmente en rumiantes adultos es parcialmente destruido en el rumen (Knight *et al.*, 1940), se ha demostrado que su suplementación oral múltiple en polvo fino como un antioxidante dietético mejora la calidad del semen en carneros después de 4 - 6 semanas de tratamiento (Jafaroghli *et al.*, 2014) e incrementa significativamente alcanzando aproximadamente el doble de sus concentraciones plasmáticas en ovejas (Parraguez *et al.*, 2011) y carneros (Cofré-Narbona *et al.*, 2016).

Por otra parte, al combinar la lipofilicidad y la hidrofiliicidad de las vitaminas C y E, pueden actuar sinérgicamente *in vivo* para reducir significativamente el daño peroxidativo (Rolf *et al.*, 1999) y el porcentaje de ADN fragmentado en el espermatozoide (Greco *et al.*, 2005). Además, se ha demostrado que su suplementación combinada por 30 días permite incrementar el estatus antioxidante del plasma seminal, la concentración espermática de los eyaculados y las características espermáticas relacionadas con fertilidad en carneros (Cofré-Narbona *et al.*, 2016). La actividad sinérgica entre ambas vitaminas para reducir el daño peroxidativo se debe a la capacidad del AA de reaccionar con los radicales tocoferoxilos y regenerar el tocoferol activo, permitiendo así su reciclaje para que continúe ejerciendo su función antioxidante (Thiele *et al.*, 1995; Cofré-Narbona *et al.*, 2016).

3. HIPOTESIS

La exposición a la altura genera estrés oxidativo alterando la espermatogénesis, la morfología espermática y reduciendo la capacidad antioxidante en el plasma seminal. Estos efectos son prevenidos por la suplementación oral con vitaminas C y E.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General.

Estudiar los efectos de la suplementación de vitaminas antioxidantes sobre la gametogénesis, la morfología espermática y el estatus antioxidante del plasma seminal en carneros expuestos a la altura en forma aguda o crónica.

4.2. Objetivos Específicos.

- I. Establecer el efecto de la exposición aguda y crónica a la altura, sobre las poblaciones celulares presentes en los túbulos seminíferos de testículos de carneros.
- II. Establecer el efecto de la exposición aguda y crónica a la altura, sobre la morfología espermática en eyaculados de carneros.
- III. Establecer el efecto de la exposición aguda y crónica a la altura, sobre estatus antioxidante del plasma seminal de carneros.
- IV. Establecer el efecto de la suplementación oral con vitaminas C y E sobre las características indicadas en los objetivos anteriores.

5. MATERIALES Y METODOS.

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (FAVET) y el Comité Asesor de Bioética de la Comisión Nacional Científica y Tecnológica (CONICYT).

Localización

El estudio se realizó en las dependencias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, y en la Estación Experimental de Altura del Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS, 3659 m.s.n.m., presión barométrica = 667 kPa), ambas de la Universidad de Chile.

Animales

Los animales considerados para este estudio correspondieron a 120 carneros mestizos, entre 1 a 2 años de edad (provenientes de pariciones de la misma temporada reproductiva), de características fenotípicas similares entre sí y de semejante peso corporal (45 - 55 kg). Setenta fueron nativos del nivel del mar. Veinte de ellos fueron mantenidos a nivel del mar (grupo BB) y los restantes cincuenta fueron llevados a la estación de altura del INCAS (grupo BA). Otros cincuenta carneros fueron nativos de la altura (> 3500 m, grupo AA) y mantenidos en el INCAS junto al grupo de animales subidos. La mitad de los animales de cada grupo fueron suplementados con vitaminas antioxidantes, como se describirá más adelante, cuyos grupos fueron denominados BBV, BAV y AAV, respectivamente.

Los animales fueron alimentados con heno de alfalfa y alimento balanceado, de acuerdo a sus requerimientos nutricionales (NRC, 1985) y dispusieron de agua *ad libitum* durante todo el estudio. La suplementación de

vitaminas para los grupos tratados correspondió a una administración diaria de 600 mg de vitamina C (ácido ascórbico) y 451 U.I. de vitamina E (-tocoferol), vía oral, durante 30 y 60 días en los animales BBV y durante 30, 60, 120, 180 y 240 días para los grupos BAV y AAV. Las dosis de vitaminas fueron calculadas sobre la base de estudios previos en ovinos mantenidos a gran altura, donde han demostrado prevenir los efectos del estrés oxidativo en ovejas mantenidas bajo las mismas condiciones experimentales (Parraguez *et al.*, 2011).

Toma de muestras

Se tomaron muestras (semen, tejido testicular y sangre) desde el comienzo del estudio (día 0, mes de diciembre) y durante los días 30 (enero), 60 (febrero), 120 (abril), 180 (junio) y 240 (agosto) posteriores al inicio de la suplementación vitamínica, tanto en los grupos tratados como en los grupos control sin vitaminas. Como se indicó en el párrafo previo, en los animales BB y BBV la toma de muestras fue sólo a los 30 y 60 días de tratamiento y sirvieron como controles para la exposición aguda a la altura de los carneros BA y BAV. Cada grupo, definido por la presencia o ausencia de suplementación vitamínica, por la altura de origen y de análisis de los animales estuvo formado por 5 individuos en cada tiempo muestral. Este “n” corresponde al número mínimo de animales necesarios para observar diferencias significativas entre grupos en función de la variabilidad del diámetro testicular en relación a la calidad seminal de carneros, considerando un $\alpha=0,05$ (Islam y Land, 1977).

Extracción y análisis de eyaculados

Los eyaculados fueron extraídos mediante electroestimulación, con un electroeyaculador especialmente diseñado para pequeños rumiantes (ruminants Minitube e320, Tiefenbach, Germany). Antes de iniciar el procedimiento de electroeyaculación, los carneros fueron sedados usando xilazina (0,2 mg kg⁻¹ peso corporal, xilazina al 2%, Centrovert, Santiago, Chile), a continuación, el

recto fue vaciado con un dedo enguantado y el área periprepuceal fue lavado con solución salina y secado cuidadosamente con toalla de papel. La sonda (diámetro: 2,5 cm, longitud: 16 cm) fue lubricada con gel de contacto ecográfico, se introdujo en el recto con los tres electrodos longitudinales orientados ventralmente y se aplicaron rampas eléctricas que consistieron en aumentos consecutivos de 0,5 V, a partir de 0 hasta un máximo de 8 V, aplicándose cada voltaje durante 3 segundos, seguido de un periodo de descanso de 3 segundos. Los eyaculados se recibieron en copas de vidrio estériles, aisladas y protegidas de la luz solar. Esta técnica se prefirió debido a la gran cantidad de animales de experimentación y la eventual ausencia de líbido sexual en los animales expuestos a la altura de manera aguda, como han reportado Monge et al. (1945). Además de ser una técnica más práctica ya que no requiere entrenamiento previo de los carneros y se puede utilizar para el examen andrológico (Matthews *et al.*, 2003).

De cada eyaculado se tomó una gota, que se colocó sobre un portaobjetos de vidrio para hacer un frotis, que fue fijado en etanol al 70% por un minuto, luego fue teñido con Hematoxilina-Eosina y se cubrió con un portaobjetos.

El resto del semen se centrifugó a 1500 g x 10 min a 4°C y el plasma seminal obtenido se almacenó a -80°C, hasta la medición de las enzimas antioxidantes y la capacidad antioxidante total.

Evaluación de anomalías espermáticas

El estudio de los frotis se llevó a cabo mediante la observación y obtención de imágenes microscópicas en 5 campos tomados al azar de cada muestra de eyaculado, utilizando una magnificación de 40x. Las imágenes se analizaron mediante la utilización del software Leica Application Suite v.1.8.0 con el fin de comparar la morfología espermática del eyaculado. En cada campo se analizó 100 espermatozoides, clasificándose en normales y anormales, considerando

las siguientes categorías según la localización de la anomalía como se describe en Barth y Oko (1989):

- Anormalidades de cabeza: cabeza pequeña, cabeza gigante, cabeza plegada, cabeza sin clasificación, cabeza suelta.
- Anormalidades de pieza media: parte intermedia distal torcida, cuello torcido, gota citoplasmática.
- Anormalidades de cola: parte principal doblada, cola enrollada, gota citoplasmática, cola doblada, cola cortada
- Anormalidades combinadas: pieza media distal torcida con gota citoplasmática y cuello torcido con cola enrollada.
- Anormalidades sin clasificación.

Los resultados para cada tipo de anomalía espermática se expresarán como porcentaje relativo.

Medición de enzimas antioxidantes y capacidad antioxidante total (TAC) en el plasma seminal

La SOD fue medida en 10 μ L de plasma seminal diluido 1:25 en tampón de muestra (50 mM Tris-HCl, pH 8,0), utilizando el Superoxide Dismutase Assay Kit® (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del proveedor. La GPx fue medida en 20 μ L de plasma seminal, usando el Glutathione Peroxidase Assay Kit® (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del proveedor. Mientras tanto, la TAC se medirá en 10 μ L de plasma seminal diluido 1:10 en tampón de ensayo (fosfato de potasio 5 mM, pH 7,4, que contiene cloruro sódico 0,9% y 0,1% de glucosa), utilizando el Antioxidant Assay Kit® (ELISA kit comercial, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, EE.UU.), siguiendo las instrucciones

del proveedor. En los ensayos de SOD y TAC, se midió la absorbancia en un lector de microplacas (DNM-9602, Perlong Medical Equipment Co. Ltd., Nanjing, China), mientras que para el caso de la GPx la absorbancia fue leída a 340 nm, cada un minuto durante 5 minutos, con un espectrofotómetro para microplacas (Epoch TM, Winooski, VT, EE.UU.).

Extracción de tejido testicular

Para la extracción de muestras de tejido testicular, se procedió a la hemicastración de los carneros. Para esto, los animales fueron sedados con Xilacina vía intramuscular (0,2 mg /kg) y luego anestesiados con Ketamina (20 mg/kg), seguido de anestesia local (Lidocaína) en el cordón testicular. Al término de la cirugía, cada carnero fue tratado con 12.000 UI de Penicilina G Procaína + 15 mg de Dihidroestreptomicina por Kg. de peso, una vez al día, durante 3 días. Luego de la recuperación, los animales fueron donados a comunidades vecinas (Putre) y a la granja educativa Mundo Granja (FAVET).

A todos los animales se les extrajo el testículo izquierdo, desde donde se tomó 0,5 cm³ de tejido de la zona ecuatorial, que fue fijado en solución Bouin alcohólico por 24 horas y luego incluido en parafina y preparado para histología corriente. Se obtuvieron cortes de 4 µm de espesor, que fueron teñidos con Ácido Peryódico de Schiff (PAS) y Hematoxilina-Eosina.

Análisis histológico del tejido testicular

El estudio histológico de las muestras de testículo se llevó a cabo mediante la observación y obtención de imágenes microscópicas en 6 campos (seleccionados de acuerdo con lo descrito más adelante), que fueron fotografiadas con un aumento de 40x. Los criterios utilizados para la selección de los campos a analizar fueron que los túbulos seminíferos presentes en cada campo presentaran un lumen equidistante de los bordes del túbulo, túbulos cuya forma no estuviese alterada por estructuras adyacentes y encontrarse en

las etapas III y/o IV del ciclo del epitelio seminífero acorde a la clasificación de Wrobel et al. (1995), con el fin de que los túbulos analizados fueran lo más homogéneos posible. Las imágenes fueron analizadas mediante la utilización del software Leica Application Suite v.1.8.0, con el fin de comparar la estructura microscópica de los túbulos seminíferos. En cada campo se analizó la altura del epitelio seminífero, el diámetro tubular y las poblaciones celulares presentes en los túbulos seminíferos, las que según las características morfológicas y tamaño de su núcleo, además de la posición de las células dentro del túbulo seminífero fueron clasificadas en: espermatogonias, espermatocitos y espermatidas (Ahmed y De Rooij, 2009). Las poblaciones celulares presentes en el epitelio seminífero fueron cuantificadas para determinar el total de espermatogonias, espermatocitos y espermatidas presentes. Para determinar la altura del epitelio seminífero se promedió la altura del epitelio germinal de cuatro puntos equidistantes dentro del túbulo seminífero. Mientras que el diámetro tubular fue determinado promediando las medidas de dos diámetros perpendiculares por túbulo (Gastel *et al.*, 1995; Bielli *et al.*, 1997). La cuantificación de las poblaciones celulares, la medición de la altura del epitelio seminífero y el diámetro tubular se realizó mediante la utilización del software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>).

Medición de las concentraciones de las vitaminas C y E en la sangre.

Se extrajo una muestra de sangre (10 mL) a cada carnero mediante venopunción de la vena yugular izquierda, usando jeringas heparinizadas. La sangre fue centrifugada (Hettich, Mikro 200R, Andreas Hettich GmbH & Co.Kg, Germany) a 1200g x 5 min y el plasma sanguíneo obtenido fue dividido en alícuotas que se almacenaron a -80°C (Ilshin, DF8514, Ilshin Lab Co.Ltd, Korea). Posteriormente, las concentraciones de las vitaminas C y E fueron medidas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC; Waters

Alliance 2695; Waters, Milford, MA, EEUU) como ha sido previamente descrito en Parraguez et al. (2011).

La vitamina C fue medida por HPLC con detección amperométrica. Las muestras de plasma fueron diluidas 10 veces en agua ultrapura, usando un electrodo de carbón vítreo operado a 800 mV y un electrodo Ag/AgCl de referencia.

La vitamina E fue medida por HPLC con detección de fluorescencia. Para la extracción de vitamina E, las muestras de plasma fueron diluidas en etanol y diclorometano. El espectrofluorímetro fue ajustado a longitudes de onda de excitación y emisión de 290- y 330-nm, respectivamente.

Análisis Estadístico

Los resultados de las variables analizadas se compararon mediante Análisis de Varianza (ANOVA) o Kruskal Wallis, dependiendo de la distribución de los datos. Se utilizó el modelo lineal general, para establecer los efectos de la exposición a la altura, los efectos del tratamiento y la interacción entre estos factores. Se utilizó la prueba de comparación múltiple de Duncan o de Dunn para determinar si existen diferencias significativas entre los resultados de los grupos cuando el ANOVA o Kruskal Wallis resultó significativo. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el software InfoStat (Infostat, 2016). Se consideró diferencias significativas cuando $P < 0,05$. Los resultados de las variables analizadas fueron expresados como promedios \pm SEM. Las tablas que muestran los resultados del análisis estadístico para cada variable se presentan en un capítulo final de "Material Complementario".

6. RESULTADOS

6.1. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la población de espermatogonias presentes en túbulos seminíferos de testículos de carneros.

En la tabla 1 se observa que entre los días 0, 30, 60 de tratamiento hubo diferencias significativas entre los grupos en la población de espermatogonias presentes en los túbulos seminíferos de testículos de carneros.

En el día 0 se observaron diferencias entre todos los grupos, donde se aprecia que los grupos expuestos a gran altura (BA y AA) presentaron mayor cantidad de espermatogonias ($P < 0,05$) que el grupo control (BB). Asimismo, los carneros nativos de gran altura (AA) presentaron la mayor población de espermatogonias ($P < 0,05$) entre los grupos.

En el día 30, se observó que los grupos nativos de gran altura (AA y AAV) tuvieron un mayor promedio de espermatogonias ($P < 0,05$) con respecto al resto de los grupos. Por otro lado, se aprecia que solo los grupos BA y BAV tuvieron diferencias significativas ($P < 0,05$). Entre los grupos BB, BBV y BAV no se observaron diferencias.

Al día 60, solo se observan diferencias según la altura de exposición ($P < 0,05$) donde los grupos expuestos a la altura (BA, BAV, AA y AAV) exhibieron un mayor promedio de espermatogonias ($P < 0,05$) que los grupos control (BB y BBV).

En los grupos expuestos a la altura por más de 60 días solo se observaron diferencias los días 180 y 240. En el día 180 solo se aprecian diferencias según la altura de origen ($P < 0,05$) donde grupos nativos de gran altura (AA y AAV)

registraron una mayor cantidad de espermatogonias (P 0,05) con respecto a los grupos nativos de baja altura (BA y BAV). En el día 240, solo se observaron diferencias según si recibieron suplementación vitamínica entre los grupos BA y BAV, por otro lado, la cantidad de espermatogonias observadas en el grupo AAV es significativamente mayor (P 0,05) en relación con los grupos nativos de baja altura (BA y BAV).

Tabla 1. Población de espermatogonias presentes en el túbulo seminífero de testículos de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.

	Días de tratamiento					
	0	30	60	120	180	240
BB	36 ± 0,8 ^c	37,5 ± 1,2 ^b	34,5 ± 1 ^b			
BBV		36 ± 1,3 ^{bc}	34,1 ± 1,2 ^b			
BA	38,9 ± 1 ^b	32,6 ± 0,9 ^c	39,3 ± 1,2 ^a	41,8 ± 1,5	34,1 ± 1,7 ^b	32,2 ± 0,9 ^c
BAV		37,1 ± 0,9 ^b	40,1 ± 1,2 ^a	45,9 ± 1,9	31,5 ± 1,4 ^b	36,4 ± 1,1 ^b
AA	44 ± 0,9 ^a	43,6 ± 1,5 ^a	40,2 ± 1,4 ^a	45,3 ± 2,1	44,6 ± 1,3 ^a	39,3 ± 1 ^{ab}
AAV		41,2 ± 1,5 ^a	39,7 ± 1,3 ^a	44,9 ± 2,2	44,1 ± 1 ^a	44,7 ± 1 ^a

En los rótulos de los grupos, la primera letra indica la altura de origen (B: baja altura; A: gran altura), la segunda letra indica la altura donde se desarrolló el experimento (B: baja altura; A: gran altura). V indica que fueron suplementados con vitaminas C y E. Letras distintas dentro de cada tiempo indican diferencia significativa entre grupos de un mismo tiempo muestral (tiempo 0, 30, 60, 120, 180 y 240: test de Kruskal Wallis y test de Dunn, P<0,05). La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas entre grupos de un mismo tiempo muestral.

6.2. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la población de espermatoцитos presentes en túbulos seminíferos de testículos de carneros.

En la tabla 2, se observa en la mayoría de los días de tratamiento, a excepción el día 120, que hubo diferencias significativas entre los grupos en la población de espermatoцитos presentes en los túbulos seminíferos.

Al inicio del tratamiento (día 0) se observó que los grupos expuestos a la altura (BA y AA) presentaron un mayor promedio de espermatoцитos (P 0,05) que el grupo control.

En el día 30 se observaron diferencias entre los grupos según su origen (baja altura vs gran altura, P 0,05), percibiéndose una mayor población de espermatoцитos (P 0,05) en los grupos AA y AAV.

En el día 60 se observó un efecto de la altura (P 0,05) donde todos los carneros expuestos a gran altura presentaron una mayor población de espermatoцитos (P 0,05) en relación con los grupos control. Por otro lado, se observaron una menor cantidad de espermatoцитos (P 0,05) entre los carneros expuestos a gran altura que fueron suplementados con vitaminas.

Al día 120 no se observaron diferencias, sin embargo, en los días 180 y 240 los carneros nativos de gran altura exhibieron una mayor población de espermatoцитos (P 0,05), por otro lado, al día 240 solo se observan diferencias según si recibieron suplementación entre los grupos BA y BAV, donde BAV registró la mayor población (P 0,05).

Tabla 2. Población de espermatoцитos presentes en el túbulo seminífero de testículos de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.

	Días de tratamiento					
	0	30	60	120	180	240
BB	50.7 ± 1.2 ^b	53 ± 1.7 ^b	48.4 ± 1.7 ^d			
BBV		49.4 ± 2.2 ^b	46.4 ± 1.6 ^d			
BA	63.6 ± 2 ^a	42.7 ± 1.2 ^c	70.9 ± 1.4 ^a	53.3 ± 2.3	43.7 ± 2.6 ^b	33.1 ± 1.7 ^b
BAV		48.1 ± 1.2 ^{cb}	64.3 ± 1.7 ^b	62.1 ± 3.1	38.5 ± 1.4 ^b	45.6 ± 1.3 ^a
AA	62.5 ± 1.9 ^a	71.7 ± 2.7 ^a	66.5 ± 2.2 ^{ab}	61.5 ± 3.5	58 ± 2.7 ^a	52.7 ± 1.7 ^a
AAV		77 ± 2.6 ^a	57.7 ± 2.3 ^c	52.7 ± 3.8	59.2 ± 1.8 ^a	52.8 ± 1.6 ^a

En los rótulos de los grupos, la primera letra indica la altura de origen (B: baja altura; A: gran altura), la segunda letra indica la altura donde se desarrolló el experimento (B: baja altura; A: gran altura). V indica que fueron suplementados con vitaminas C y E. Letras distintas dentro de cada tiempo indican diferencia significativa entre grupos de un mismo tiempo muestral (tiempo 0, 30, 60, 120, 180 y 240: test de Kruskal Wallis y test de Dunn, P<0,05). La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas entre grupos de un mismo tiempo muestral.

6.3. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la población de espermátidas presentes en túbulos seminíferos de testículos de carneros.

En la tabla 3, se observa que hubo diferencias significativas entre los grupos en la mayoría de los días de tratamiento, a excepción del día 120.

Al comienzo del tratamiento (día 0) se observaron diferencias entre todos los grupos de carneros, donde los grupos expuestos a la altura (BA y AA) exhibieron mayores poblaciones de espermátidas (P 0,05) que el grupo control (BB).

En el día 30 se aprecia que los carneros nativos de altura (AA y AAV) presentaron una mayor población de espermátidas (P 0,05), siendo los valores

del grupo AAV los que alcanzaron valores más altos ($P < 0,05$). Por otra parte, se observó un menor promedio de espermátidas ($P < 0,05$) entre los carneros nativos de baja altura en los que fueron expuestos a altura (BA).

En el día 60, se observó que los grupos expuestos a altura (BA, BAV, AA y AAV) presentaron mayores poblaciones de espermátidas ($P < 0,05$) que los grupos control (BB y BBV). También se distingue entre los carneros nativos de altura, que el grupo suplementado (AAV) mostró una menor cantidad de espermátidas ($P < 0,05$).

En el día 120 no se observaron diferencias entre los grupos. En cambio, al día 180 se observó que la población de espermátidas es mayor en los grupos nativos de altura ($P < 0,05$).

En el día 240 solo se observó que la cantidad de espermátidas del grupo BA es menor ($P < 0,05$) en relación con los grupos AA y AAV.

Tabla 3. Población de espermátidas presentes en el túbulo seminífero de testículos de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.

	Días de tratamiento					
	0	30	60	120	180	240
BB	97,9 ± 2,8 ^c	110,5 ± 3,9 ^c	85,7 ± 3,3 ^c			
BBV		97,7 ± 5,3 ^{cd}	82,9 ± 4 ^c			
BA	114,7 ± 4 ^b	95,2 ± 3,6 ^d	123,9 ± 4,1 ^a	122,3 ± 6,4	104,4 ± 5,4 ^b	81,8 ± 4,2 ^b
BAV		98,2 ± 3 ^{cd}	119,3 ± 4 ^a	144,8 ± 8,7	105 ± 4,6 ^b	98,5 ± 3,8 ^{ab}
AA	135,8 ± 3,1 ^a	130,4 ± 6,6 ^b	116,4 ± 3,8 ^a	142,2 ± 8,9	137,8 ± 5 ^a	107,1 ± 3,7 ^a
AAV		153,1 ± 4,7 ^a	97,4 ± 4,5 ^b	116,2 ± 9,1	144,9 ± 4,8 ^a	113,8 ± 4,1 ^a

En los rótulos de los grupos, la primera letra indica la altura de origen (B: baja altura; A: gran altura), la segunda letra indica la altura donde se desarrolló el experimento (B: baja altura; A: gran altura). V indica que fueron suplementados con vitaminas C y E. Letras distintas dentro de cada tiempo indican diferencia significativa entre grupos de un mismo tiempo muestral (tiempo 0, 30, 60, 120, 180 y 240: test de Kruskal Wallis y test de Dunn, P<0,05). La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas entre grupos de un mismo tiempo muestral.

6.4. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la altura del epitelio seminífero de los túbulos seminíferos de testículos de carneros.

En la Tabla 4 se observa que en todos los días de tratamiento hubo diferencias significativas entre los grupos en la altura promedio del epitelio seminífero.

Al comienzo del tratamiento (día 0) se observaron diferencias según la altura de exposición (P 0,05), donde los carneros expuestos a la altura (BA y AA) presentaron una mayor altura del epitelio seminífero (P 0,05).

Al día 30, los carneros nativos de altura (AA y AAV) tuvieron mayores alturas epiteliales (P 0,05) que los grupos nativos de baja altura (BB, BBV, BA y BAV).

Por otra parte, que el grupo suplementado BAV presentó una mayor altura que el grupo BA (P 0,05).

En el día 60, se observó que entre los grupos no suplementados hay diferencias según la altura de exposición (P 0,05) donde los grupos BA y AA presentaron las mayores alturas epiteliales (P 0,05). Por otra parte, los grupos suplementados (BAV y AAV) exhibieron una menor altura del epitelio seminífero (P 0,05) en relación con los no suplementados (BA y AA). En cambio, entre los grupos controles, los carneros suplementados (BBV) fueron los que presentaron la mayor altura promedio (P 0,05).

En el día 120 no se observaron diferencias, sin embargo, en el día 180, se distinguieron diferencias según la altura de origen (P 0,05), donde los grupos nativos de gran altura (AA y AAV) presentaron mayores promedios de la altura del epitelio (P 0,05).

En el día 240, solo se percibe que el grupo BA presentó la menor altura epitelial (P 0,05). Por otro lado, entre los grupos BAV, AA y AAV no se observaron diferencias.

Tabla 4. Altura promedio del epitelio seminífero de testículos de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.

	Días de tratamiento					
	0	30	60	120	180	240
BB	50,6 ± 0,4 ^b	51,6 ± 0,4 ^c	49,3 ± 0,7 ^c			
BBV		52,5 ± 0,7 ^c	53 ± 0,9 ^b			
BA	61,5 ± 0,8 ^a	52,9 ± 0,6 ^c	60,9 ± 8,7 ^a	61 ± 1,3	56,5 ± 1,2 ^{bc}	54,5 ± 0,8 ^b
BAV		55,5 ± 0,8 ^b	52,7 ± 0,9 ^b	64,7 ± 1,6	54,5 ± 0,9 ^c	58 ± 0,9 ^a
AA	62,2 ± 0,9 ^a	61 ± 1,4 ^a	61,4 ± 0,9 ^a	62,2 ± 1,58	63,5 ± 1,5 ^a	58,6 ± 0,8 ^a
AAV		62,2 ± 1,1 ^a	54,8 ± 0,9 ^b	60,9 ± 2,23	62 ± 1,4 ^{ab}	58,5 ± 0,9 ^a

En los rótulos de los grupos, la primera letra indica la altura de origen (B: baja altura; A: gran altura), la segunda letra indica la altura donde se desarrolló el experimento (B: baja altura; A: gran altura). V indica que fueron suplementados con vitaminas C y E. Letras distintas dentro de cada tiempo indican diferencia significativa entre grupos de un mismo tiempo muestral (tiempo 0, 30, 60, 120, 180 y 240: test de Kruskal Wallis y test de Dunn, $P < 0,05$). La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas entre grupos de un mismo tiempo muestral.

6.5. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre el diámetro tubular promedio de túbulos seminíferos de testículos de carneros.

En la tabla 5, en todos los días de tratamiento se observaron diferencias entre los grupos en el diámetro tubular promedio.

En el día 0 se observó que el diámetro tubular de los carneros expuestos a la altura (BA y AA) fue mayor que en el grupo control ($P < 0,05$).

En el día 30, el menor diámetro tubular ($P < 0,05$) fue observado en el grupo BA, en cambio, los mayores valores se apreciaron en los carneros nativos de gran altura (AA y AAV). Por otra parte, se advirtió entre los grupos de carneros expuestos a la altura que los que fueron suplementados (BAV y AAV)

presentaron un mayor diámetro tubular (P 0,05) que los que no fueron suplementados (BA y AA), respectivamente.

Al día 60, se observaron diferencias según la altura de exposición (P 0,05) donde el menor diámetro tubular (P 0,05) se observó en los carneros no expuestos a la altura (BB y BBV). Por otro lado, se observaron diferencias entre los carneros expuestos a altura según si recibieron suplementación vitamínica donde los suplementados (BAV y AAV) presentaron un menor diámetro tubular (P 0,05).

En el día 120, solo se observaron diferencias entre los grupos suplementados (BAV y AAV), donde los carneros nativos de altura (AAV) presentan un menor diámetro promedio (P 0,05).

Al día 180 se presencié un mayor diámetro tubular (P 0,05) en los grupos nativos de altura (AA y AAV).

Al día 240, se observó que el grupo BA presentó el menor diámetro tubular (P 0,05). Por otro lado, a pesar de que no se observaron diferencias del grupo AA con respecto a los suplementados BAV y AAV, los carneros suplementados si presentaron diferencia según su altura de origen donde el menor diámetro tubular correspondió al grupo BAV (P 0,05).

Tabla 5. Diámetro tubular promedio de testículos de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.

	Días de tratamiento					
	0	30	60	120	180	240
BB	173 ± 1.1 ^b	178 ± 1.4 ^c	167 ± 1.6 ^c			
BBV		180 ± 1.9 ^c	168 ± 1.9 ^c			
BA	199 ± 1.7 ^a	166 ± 1.2 ^d	195 ± 1.7 ^a	193 ± 2.9 ^{ab}	179 ± 4.3 ^b	166 ± 2.8 ^c
BAV		175 ± 1.4 ^c	182 ± 2.8 ^b	198 ± 2.7 ^a	176 ± 2.8 ^b	182 ± 2.3 ^b
AA	201 ± 1.9 ^a	189 ± 2.6 ^b	190 ± 2.3 ^a	189 ± 3.6 ^{ab}	197 ± 3.2 ^a	187 ± 2.6 ^{ab}
AAV		199 ± 2.3 ^a	175 ± 2.8 ^b	184 ± 6 ^b	204 ± 2.1 ^a	191 ± 2.3 ^a

En los rótulos de los grupos, la primera letra indica la altura de origen (B: baja altura; A: gran altura), la segunda letra indica la altura donde se desarrolló el experimento (B: baja altura; A: gran altura). V indica que fueron suplementados con vitaminas C y E. Letras distintas dentro de cada tiempo indican diferencia significativa entre grupos de un mismo tiempo muestral (tiempo 0, 30, 60, 120, 180 y 240: test de ANOVA y test de Duncan, P<0,05).

6.6. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la morfología espermática en eyaculados de carneros.

En la tabla 6 se presenta el porcentaje de anomalías espermáticas, donde solo hasta el día 60 de tratamiento se observaron diferencias entre los grupos.

El porcentaje de anomalías espermáticas del grupo BA fue el mayor durante los días 0, 30 y 60 (P 0,05). Por otro lado, el grupo BAV solo presentó un mayor valor de anomalías al día 30 en relación con los grupos BB, BBV, AA y AAV (P 0,05).

No se observaron efectos de la suplementación con vitaminas entre los grupos en el porcentaje de anomalías espermáticas. A partir del día 120 no se observaron diferencias significativas.

Tabla 6. Porcentaje de anomalías espermáticas totales en eyaculados de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.

	Días de tratamiento					
	0	30	60	120	180	240
BB	4,3 ± 1,1 ^b	7,5 ± 1,1 ^b	5,8 ± 1,2 ^b			
BBV		5,1 ± 1,1 ^b	6,2 ± 2 ^b			
BA	10,4 ± 1,1 ^a	12,1 ± 1,1 ^a	11,8 ± 1,8 ^a	7,3 ± 1	4,8 ± 0,8	9,2 ± 1,1
BAV		10,7 ± 0,9 ^a	10 ± 1,5 ^{ab}	3,6 ± 0,5	6,1 ± 0,8	7,8 ± 1,3
AA	7,3 ± 1 ^{ab}	6 ± 0,7 ^b	8,9 ± 1,1 ^{ab}	9,7 ± 1,2	6,2 ± 0,9	7 ± 1,3
AAV		5,3 ± 0,7 ^b	6,3 ± 1,3 ^b	7,8 ± 0,9	3,7 ± 0,7	6,6 ± 1

En los rótulos de los grupos, la primera letra indica la altura de origen (B: baja altura; A: gran altura), la segunda letra indica la altura donde se desarrolló el experimento (B: baja altura; A: gran altura). V indica que fueron suplementados con vitaminas C y E. Letras distintas dentro de cada tiempo indican diferencia significativa entre grupos de un mismo tiempo muestral (tiempo 0, 30, 60, 120, 180 y 240: test de Kruskal Wallis y test de Dunn, $P < 0,05$). La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas entre grupos de un mismo tiempo muestral.

6.7. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la actividad de Glutación Peroxidasa (GPx) en el plasma seminal de carneros.

En la tabla 7, se observa que la mayoría de los días de tratamiento, excepto los días 120 y 180, se encontraron diferencias significativas en la actividad de GPx en el plasma seminal.

La mayor actividad de GPx seminal se observó en los grupos controles (BB y BBV) durante los días 0, 30 y 60 (P 0,05). Por otra parte, en el día 0 se advierte que, el grupo BA presentó la actividad más baja (P 0,05).

Al día 30, se observaron diferencias tanto entre los grupos control como en los nativos de altura, según si recibieron suplementación vitamínica (P 0,05), donde los grupos suplementados (BBV y AAV) presentaron mayor actividad que los no suplementados (BB y AA) (P 0,05), respectivamente.

Al día 60 se observó entre los carneros expuestos a la altura que la mayor actividad de GPx (P 0,05) la presentaron los carneros nativos de gran altura (AA y AAV).

Entre los días 120 y 180 no se observaron diferencias, sin embargo, al día 240 solamente se observó que el grupo BAV tiene una mayor actividad enzimática que el grupo AA (P 0,05).

Tabla 7. Actividad de Glutación Peroxidasa en el plasma seminal de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.

	Días de tratamiento					
	0	30	60	120	180	240
BB	248,5 ± 18,8 ^a	209,8 ± 23,5 ^b	300,3 ± 18,9 ^a			
BBV		275,3 ± 15,9 ^a	312 ± 9,7 ^a			
BA	55,6 ± 5,6 ^c	72,5 ± 5,3 ^d	77,9 ± 8,3 ^c	88 ± 5,2	133,3 ± 10,3	91,3 ± 6,4 ^{ab}
BAV		87,4 ± 12,8 ^d	84,1 ± 10,2 ^c	109,2 ± 9,6	142,7 ± 6,7	116,1 ± 15,1 ^a
AA	93,6 ± 8 ^b	99,2 ± 10,5 ^d	124,2 ± 6,5 ^b	106,1 ± 13,9	117,1 ± 15,1	68,2 ± 13,5 ^b
AAV		145,2 ± 7,9 ^c	134,4 ± 14,3 ^b	124,5 ± 14,4	111,6 ± 13,8	94,3 ± 9 ^{ab}

En los rótulos de los grupos, la primera letra indica la altura de origen (B: baja altura; A: gran altura), la segunda letra indica la altura donde se desarrolló el experimento (B: baja altura; A: gran altura). V indica que fueron suplementados con vitaminas C y E. Letras distintas dentro de cada tiempo indican diferencia significativa entre grupos de un mismo tiempo muestral (tiempo 0, 30, 60, 120, 180 y 240: test de ANOVA y test de Duncan, P<0,05). La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas entre grupos de un mismo tiempo muestral.

6.8. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la actividad de Superóxido Dismutasa (SOD) en el plasma seminal de carneros.

En la tabla 8 solo hasta el día 60 de tratamiento se observan diferencias entre los grupos en la actividad de SOD seminal.

Desde el comienzo del tratamiento (día 0) hasta el día 60 se observó que en los grupos expuestos a la altura se registró la menor actividad de SOD (P 0,05). Sin embargo, en el día 30 se observó que los grupos expuestos a la altura que han sido suplementados con vitaminas no tendrían diferencias significativas con el grupo BB. Aun así, no se observaron efectos de la

suplementación con vitaminas entre los grupos sobre la actividad de SOD seminal.

A partir del día 120 no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 8. Actividad de Superóxido Dismutasa en el plasma seminal de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.

	Días de tratamiento					
	0	30	60	120	180	240
BB	47,3 ± 6,9 ^a	47,9 ± 8,7 ^{ab}	73 ± 5,2 ^a			
BBV		61,4 ± 6,8 ^a	70,3 ± 7,9 ^a			
BA	27,6 ± 3,2 ^b	25 ± 7,8 ^c	11 ± 1,6 ^b	21,9 ± 3,1	22,2 ± 2	18,4 ± 5,4
BAV		38,9 ± 5,3 ^{bc}	11,5 ± 2,2 ^b	15 ± 2,6	19,2 ± 2	19,9 ± 3,4
AA	27 ± 2,7 ^b	17,9 ± 4 ^c	13,5 ± 2,5 ^b	16,8 ± 3,2	21,5 ± 4,7	25,3 ± 7,9
AAV		30 ± 6,8 ^{bc}	10,8 ± 1,8 ^b	17,2 ± 3,7	20,3 ± 1,9	24,8 ± 6,7

En los rótulos de los grupos, la primera letra indica la altura de origen (B: baja altura; A: gran altura), la segunda letra indica la altura donde se desarrolló el experimento (B: baja altura; A: gran altura). V indica que fueron suplementados con vitaminas C y E. Letras distintas dentro de cada tiempo indican diferencia significativa entre grupos de un mismo tiempo muestral (tiempo 0, 30, 60, 120, 180 y 240: test de ANOVA y test de Duncan, P<0,05). La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas entre grupos de un mismo tiempo muestral.

6.9. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la Capacidad Antioxidante Total (TAC) en el plasma seminal de carneros.

En la tabla 9, la mayoría de los días de tratamiento, excepto en los días 0 y 180, se observan diferencias significativas en la TAC seminal entre los grupos.

Al inicio del tratamiento (día 0) no se observaron diferencias significativas entre los grupos. No obstante, en el día 30 solo se observó diferencias entre los grupos BA y BAV, donde la mayor TAC se percibió en el grupo BAV (P 0,05).

Al día 60 no se observaron diferencias entre los grupos expuestos a la altura y los grupos control. Sin embargo, en los días 60 y 120 se advierte que los carneros nativos de baja altura (BA y BAV) exhibieron menores TAC seminales (P 0,05) que los carneros nativos de altura (AA y AAV).

En el día 180 no se observaron diferencias, no obstante, al día 240 se distingue que el grupo BA manifestó una menor TAC que el grupo AA (P 0,05).

Tabla 9. Capacidad antioxidante total (TAC) del plasma seminal de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 240 días.

	Días de tratamiento					
	0	30	60	120	180	240
BB	2,1 ± 0,2	1,6 ± 0,2 ^{ab}	1,8 ± 0,3 ^{ab}			
BBV		2 ± 0,3 ^a	1,4 ± 0,1 ^{ab}			
BA	2 ± 0,2	1,3 ± 0,1 ^b	0,8 ± 0,3 ^c	1,3 ± 0,2 ^b	2,2 ± 0,4	1,1 ± 0,2 ^b
BAV		1,9 ± 0,1 ^a	1,2 ± 0,2 ^{bc}	1,4 ± 0,1 ^b	1,8 ± 0,2	1,6 ± 0,3 ^{ab}
AA	2,1 ± 0,2	1,9 ± 0,1 ^a	2,1 ± 0,1 ^a	1,9 ± 0,0 ^a	1,8 ± 0,3	1,9 ± 0,1 ^a
AAV		1,6 ± 0,1 ^{ab}	1,9 ± 0,2 ^a	1,9 ± 0,1 ^a	2,7 ± 0,5	1,7 ± 0,3 ^{ab}

En los rótulos de los grupos, la primera letra indica la altura de origen (B: baja altura; A: gran altura), la segunda letra indica la altura donde se desarrolló el experimento (B: baja altura; A: gran altura). V indica que fueron suplementados con vitaminas C y E. Letras distintas dentro de cada tiempo indican diferencia significativa entre grupos de un mismo tiempo muestral (tiempo 0, 30, 60, 120, 180 y 240: test de ANOVA y test de Duncan, P<0,05). La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas entre grupos de un mismo tiempo muestral.

6.10. Efectos la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la concentración de vitamina C en el plasma sanguíneo de carneros.

En la figura 1 solo se distinguen diferencias los días 30 y 60 entre los grupos en la concentración de vitamina C en el plasma sanguíneo.

Al día 0 no se observaron diferencias entre los grupos. Sin embargo, los días 30 y 60 se aprecia una mayor concentración de vitamina C sanguínea (P 0,05) en los grupos que recibieron suplementación con vitaminas (BBV, BAV y AAV) con respecto a los no suplementados (BB, BA y AA).

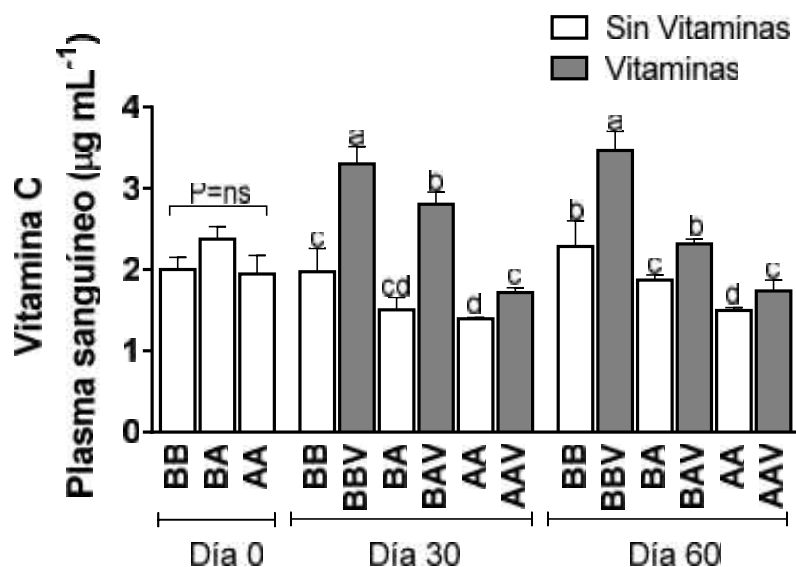


Figura 1. Concentración de Vitamina C en el plasma sanguíneo de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 60 días. En los rótulos de los grupos, la primera letra indica la altura de origen (B: baja altura; A: gran altura), la segunda letra indica la altura donde se desarrolló el experimento (B: baja altura; A: gran altura). V indica que fueron suplementados con vitaminas C y E. La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas entre grupos de un mismo tiempo muestral. Letras distintas dentro de cada tiempo indican diferencia significativa entre grupos de un mismo tiempo muestral (tiempo 0, 30, 60, 120, 180 y 240: test de ANOVA y test de Duncan, $P < 0,05$).

6.11. Efectos de la exposición aguda y crónica a la altura, y de la suplementación oral con vitaminas sobre la concentración de vitamina E en el plasma sanguíneo de carneros.

En la figura 2 solo se observan diferencias los días 30 y 60 entre los grupos en la concentración de vitamina E en el plasma sanguíneo.

Al día 0 no se aprecian diferencias entre los grupos. Por otra parte, en los días 30 y 60 se observó que la concentración de vitamina en el plasma de la mayoría de los grupos suplementados es mayor con respecto a los no suplementados. Sin embargo, al día 30 no se observaron diferencias entre los grupos AA y AAV y la misma situación se distingue al día 60 entre los grupos BA y BAV.

Cabe destacar, que ambas mediciones de vitaminas (figura 1 y 2) se observó que en los días 30 y 60 en el grupo BBV se registraron las mayores concentraciones en el plasma ($P < 0,05$).

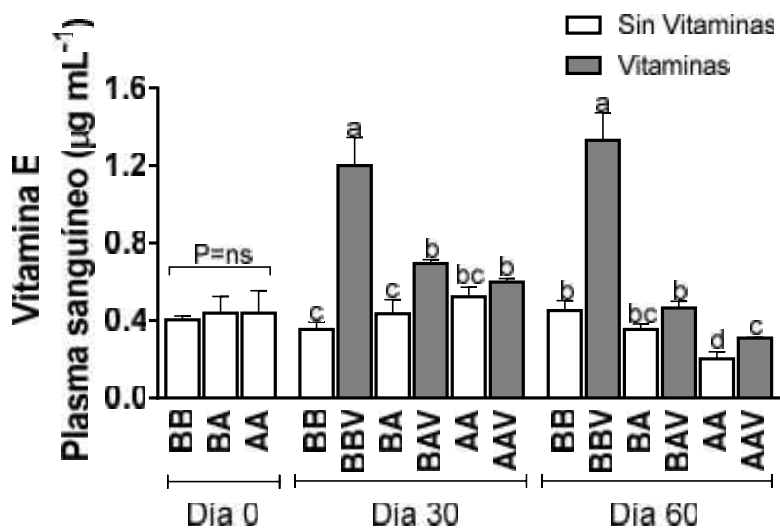


Figura 2. Concentración de Vitamina E en el plasma sanguíneo de carneros controles y expuestos a gran altitud con y sin suplementación con vitaminas C y E durante 60 días. En los rótulos de los grupos, la primera letra indica la altura de origen (B: baja altura; A: gran altura), la segunda letra indica la altura donde se desarrolló el experimento (B: baja altura; A: gran altura). V indica que fueron suplementados con vitaminas C y E. La ausencia de letras indica que no hubo diferencias significativas entre grupos de un mismo tiempo muestral. Letras distintas dentro de cada tiempo indican diferencia significativa entre grupos de un mismo tiempo muestral (tiempo 0, 30, 60, 120, 180 y 240: test de ANOVA y test de Duncan, $P < 0,05$).

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio se analizó el efecto de la suplementación oral con vitaminas C y E en la gametogénesis, la morfología espermática y el estatus redox del semen en carneros mantenidos bajo condiciones de hipoxia hipobárica. También se evaluó el efecto de la adaptación que tienen los carneros que han vivido a una altura superior a 3500 m.s.n.m por varias generaciones frente a carneros nativos del nivel del mar expuestos recientemente a la altura.

Es importante señalar que es el único estudio realizado en carneros que ha evaluado el efecto de la hipoxia natural en la gametogénesis y el estatus redox del semen. Por otro lado, la mayoría de los estudios relacionados con hipoxia hipobárica son llevados a cabo en condiciones de laboratorio a gran altura o cámaras hipobáricas las cuales no involucran todas las variables ambientales que se observan en condiciones naturales.

Con respecto a la suplementación oral con vitaminas C y E, se ha observado que los niveles plasmáticos de estas vitaminas se encontraron incrementados en todos los grupos que fueron suplementados a partir del día 30. Estos resultados coinciden con lo reportado por Hidiroglou (1999) en vacas, quién observó que la suplementación oral en múltiples dosis de vitamina C, como polvo fino, incrementó las concentraciones plasmáticas de AA, alcanzando su máxima concentración a las 30 horas post administración. Además, estudios realizados previamente en carneros a nivel del mar (Cofré *et al.*, 2016) y ovejas mantenidas a diferentes condiciones de altura (Parraguez *et al.*, 2011) confirman estos resultados, donde el incremento en las concentraciones plasmáticas de las vitaminas C y E en los animales suplementados también fue asociado con la prevención de efectos perjudiciales de la gran altura sobre los parámetros reproductivos. Por otro lado, las elevadas concentraciones

plasmáticas de vitamina C registradas en los animales suplementados sugieren que existe una absorción digestiva importante, a pesar de que en la literatura se señala que es parcialmente destruida en el rumen (Knight *et al.*, 1940). Al contrario de los resultados de este trabajo, Knight *et al.* (1940) reportó en una vaca una destrucción completa de la vitamina C en el rumen y por lo tanto, no se incrementarían las concentraciones de AA en el plasma sanguíneo. Aun cuando estos autores utilizaron mayores concentraciones de vitaminas (100 g de vitamina C) que las empleadas en el presente estudio (600 mg de vitamina C), tales diferencias podrían deberse probablemente a la baja sensibilidad del método de análisis empleado en el experimento. Actualmente existen métodos de análisis más modernos y sensibles como el HPLC. Adicionalmente, el empleo de solo un animal en este experimento sumado al breve tiempo de duración del estudio (24 horas), podrían haber influido en los resultados reportados por este autor.

En este estudio, los carneros expuestos de forma aguda y crónica a la altura presentaron, en sus túbulos seminíferos, poblaciones celulares (espermatogonias, espermátocitos y espermátidas) más abundantes que los grupos control al día 0 y 60 del tratamiento. Sin embargo, en otro estudio llevado a cabo simultáneamente en la misma población de carneros, reportó que los grupos control presentaron, entre los días 0 y 60, eyaculados con una mayor concentración espermática que los grupos expuestos a la altura (Narbona, 2018). Estos resultados, aparentemente contradictorios, podrían explicarse teniendo en cuenta que, por efecto de la HH, los grupos expuestos a la altura presentan una alteración en la espermatogénesis que enlentece o detiene la diferenciación celular, también denominada arresto espermatogénico (Farías *et al.*, 2005a; Farías *et al.*, 2010; Zepeda *et al.*, 2012; Guven *et al.*, 2014; Narbona, 2018) que se manifestaría principalmente a nivel de las espermátidas y alteraría, entre otras cosas, la liberación de células espermáticas maduras del epitelio seminífero (Liao *et al.*, 2010) y, como

resultado, se observaría una mayor población de espermátidas en sus etapas finales de diferenciación presentes en el epitelio seminífero y una menor concentración de espermatozoides en el eyaculado. Otra posible explicación a las mayores poblaciones celulares en los grupos de carneros expuestos a la altura tendría relación con el tipo de manejo, debido a que los grupos mantenidos a baja altura nunca estuvieron en contacto con hembras, a diferencia de los carneros expuestos a gran altura que provenían de rebaños en los cuales se encontraban mezclados permanentemente con hembras. Existen estudios donde se ha sugerido que la proximidad de las hembras al macho, por efecto de estímulos táctiles, visuales y olfatorios, incitaría la actividad reproductiva del carnero e incrementaría el tamaño testicular, la secreción de testosterona, la actividad sexual y la agresividad (Illius *et al.*, 1975; Illius *et al.*, 1976). Por otra parte, Martin *et al.* (1990) observó que tan solo la proximidad de ovejas (sin la necesidad de contacto físico), tanto en estro como en anestro, incrementaban la secreción de LH en carneros. Probablemente, la proximidad de las hembras en los grupos de carneros expuestos a la altura podría haber influido en una mayor actividad de la espermatogénesis producto de una mayor secreción de hormonas gonadotrópicas, aunque no se encontraron estudios que demuestren la presencia de modificaciones en la celularidad espermática producto de este tipo de estímulo.

A pesar de que en la población de espermatogonias se observaron mayores cantidades de células los días 0 y 60 en los grupos a gran altura, al día 30 el grupo BA presentó una menor población de espermatogonias, respecto a los grupos control, lo que podría atribuirse a una apoptosis de las espermatogonias inducida por hipoxia hipobárica (Liao *et al.*, 2010). Por otro lado, el grupo BAV registró poblaciones similares a los grupos control, lo que sugiere que el efecto negativo de la HH puede ser contrarrestado por la suplementación con vitaminas antioxidantes. Estos resultados difieren a los obtenidos en un estudio con ratas de Shevantaeva y Kosyuga (2006), quienes expusieron ratas a una

simulación crítica de HH (11.500 – 12.000 msnm), donde no se observaron diferencias en las poblaciones de espermatogonias al día 0 post exposición a HH, mientras que al día 30 y 60 se observaron menores poblaciones de espermatogonias en los grupos que habían sido sometidos a HH respecto a los grupos no expuestos a HH.

En la población de espermatoцитos se observó un resultado similar al anterior, donde al día 30 el grupo BA también presentó una menor población respecto del grupo control, lo que podría atribuirse a un efecto supresivo de la hipoxia sobre la espermatogénesis, que causaría la disminución de la población de espermatoцитos, y a un aumento de la apoptosis. Si bien estos resultados son consistentes con lo reportado en ratas expuestas a HH por Shevantaeva y Kosyuga (2006) durante el día 0 y al día 30, difieren al día 60, donde las poblaciones de espermatoцитos continuaron siendo menores respecto al grupo control. En otro estudio realizado en ratas (Liao *et al.*, 2010), se registró una situación similar al día 30, donde se observó un menor porcentaje relativo de espermatoцитos en relación con el grupo control. Por otra parte, se observó que los grupos BAV y AAV al día 60 presentaron menores poblaciones que los grupos BA y AA. Es probable que los efectos perjudiciales de la HH sobre la población de espermatoцитos hayan gatillado un arresto espermatogénico que enlentecería o detendría la meiosis de los espermatoцитos primarios, observándose una acumulación de espermatoцитos en el epitelio germinal. Este suceso podría corresponder a una medida de protección ambiental, con el fin de evitar la generación de espermatozoides defectuosos en el testículo (Farías *et al.*, 2010). Por otro lado, la suplementación con vitaminas disminuiría el grado de arresto espermatogénico lo que, en conjunto con una proliferación celular disminuida, podría explicar las menores poblaciones de espermatoцитos en los grupos BAV y AAV.

En cuanto a la población de espermátidas, las mayores poblaciones observadas al día 0 y 60 en los grupos sometidos a la altura respecto al grupo control, podrían ser causados por la inhibición de la liberación de células espermáticas maduras del epitelio seminífero a causa de la HH (Liao *et al.*, 2010). No obstante, al día 30 la población de espermátidas en los grupos BA y BAV no difieren significativamente del grupo control, a diferencia de los grupos AA y AAV cuyas poblaciones continuaron siendo superiores. Esto podría deberse a que, por efecto de la HH, se incrementaría la apoptosis de espermátidas en los grupos BA y BAV, por lo tanto, disminuiría su población. En estudios con ratas realizados por Liao *et al.* (2010) se obtuvieron resultados similares, donde los grupos expuestos durante 5 y 15 días a la altura manifestaron un incremento en sus porcentajes relativos de espermátidas presentes en el túbulo seminífero. Por otro lado, también se reportó una disminución de los porcentajes relativos al día 30 a valores similares al grupo no expuesto a la altura. Estos resultados son distintos a los reportados por Shevantaeva y Kosguya (2006) en ratas, donde se observó que a partir del día 3 y al día 30 y 60 las espermátidas observadas en ratas expuestas a HH presentaron menores poblaciones que los grupos control. Las diferencias encontradas con el estudio de Shevantaeva y Kosyuga (2006), tanto en poblaciones de espermatogonias, espermaticitos y espermátidas, podrían estar relacionadas con las distintas metodologías empleadas en ambos estudios. Por una parte, la simulación a una situación extremadamente crítica de HH empleada en las ratas (11.500 – 12.000 msnm) genera una hipoxia severa, lo que podría haber exacerbado también el estrés oxidativo en las células germinales y, por otro lado, el muestreo en las ratas se realizó en un periodo posterior a la exposición a HH, por lo que no se evaluó si existía alguna respuesta de adaptación a la altura.

Entre los días 60 y 120 no se observaron diferencias significativas entre los grupos expuestos a la altura, lo que sugiere que los animales expuestos de forma aguda sufrieron un proceso de aclimatación y, como consecuencia, el

daño oxidativo y sus necesidades antioxidantes, que se encontraban incrementadas con la exposición a la altura, habrían disminuido paulatinamente. No obstante, al día 60 se observó un efecto de las vitaminas en el grupo AAV presentando un mayor número de espermátidas con respecto a AA. Esta diferencia podría atribuirse a que las vitaminas ayudarían a liberar las espermátidas maduras que encuentran inhibida su liberación por efecto de la HH. Por otra parte, a partir del día 180 (Junio, invierno en hemisferio sur) los grupos nativos de baja altura tuvieron menores poblaciones de espermatogonias, espermatoцитos y espermátidas que los nativos de altura, lo que podría estar relacionado con cambios estacionales característicos de la funcionalidad reproductiva del carnero durante los días largos (temporada no reproductiva) (Mortimer y Lincoln, 1982; Hochereau-de Reviers *et al.*, 1985; Gastel *et al.*, 1995; Bielli *et al.*, 1997), los cuales serían más marcados en los carneros nativos de baja altura con respecto a los nativos de altura, por ello no se observaría el efecto de la suplementación con vitaminas. Hochereau-de Reviers *et al.* (1985) reportó una disminución en la producción de espermatoцитos primarios y espermátidas redondas en carneros expuestos a días largos, que está relacionado con una reducción de la eficiencia de la espermatogénesis, debido a la secreción reducida de hormonas gonadotrópicas durante la temporada no reproductiva.

Respecto a la altura del epitelio seminífero, se observó una menor altura en los carneros sometidos a exposición aguda a la altura (día 30), con respecto a los nativos de altura, lo que podría deberse a una disminución en la proliferación de las células germinales y al incremento de la apoptosis por efecto de la HH. Estos resultados son consistentes con estudios previos realizados en ratas (Farías *et al.*, 2005b; Bustos-Obregón *et al.*, 2010; Abdalla *et al.*, 2016), donde se reportó una menor altura del epitelio seminífero a los pocos días de ser expuestos a HH tanto en condiciones experimentales como en condiciones naturales a alturas entre los 2.800 – 4.600 m.s.n.m. Por otra parte, se observa

que el grupo BAV tiene mayor altura del epitelio seminífero que el grupo BA, lo que sugiere que la suplementación con vitaminas reduciría el daño oxidativo causado por la exposición aguda a la altura sobre el epitelio seminífero. Al día 60 se observó que los grupos expuestos a la altura tienen mayores alturas epiteliales que los grupos control y los suplementados con vitaminas. Por otro lado, el grupo BA exhibió una altura promedio similar a la observada en el mismo grupo al día 0, lo que podría sugerir que hubo una recuperación del epitelio germinal afectado al día 30. Sin embargo, los resultados del presente estudio al día 60 no concuerdan con lo observado por Farías et al. (2005a) en ratas sometidas a HH intermitente, en condiciones experimentales, donde evidenció una disminución en la altura del epitelio seminífero luego de 60 días de exposición a HH intermitente. No obstante, otros estudios en ratas sometidas a HH han reportado una recuperación de la altura del epitelio a partir del día 32 (Abdalla *et al.*, 2016) y 42 (Bustos-Obregón *et al.*, 2010) de exposición, lo cual coincidiría con los resultados observados en nuestro estudio. Por otra parte, es paradójal el resultado de los grupos BAV y AAV que presentaron menores alturas del epitelio seminífero que los BA y AA, contrario a lo esperado. Esta menor altura se encontraría relacionada con las menores poblaciones de espermatoцитos y espermátidas observadas en los mismos grupos al día 60. Una posible explicación es que las vitaminas disminuirían el grado del arresto espermatogénico, por lo cual se liberarían las células espermáticas maduras retenidas en el epitelio seminífero lo que contribuiría a la menor altura del epitelio.

En cuanto al diámetro de los túbulos seminíferos, éstos son coherentes con la altura del epitelio seminífero observada. Al corto plazo (día 30) hubo un menor diámetro en el grupo BA, lo que estaría relacionado con las menores alturas epiteliales de los túbulos observados. Estos resultados coinciden con lo observado en los trabajos de Zepeda et al. (2012) y Bustos-Obregón et al. (2006) en ratas y ratones sometidos a HH intermitente en cámaras hipobáricas.

Sin embargo, Abdalla *et al.* (2016) evidenció que el diámetro tubular de ratas expuestas a gran altitud (2800 msnm) no presentaron cambios significativos en relación con ratas expuestas a baja altitud (40 msnm). Tales diferencias podrían deberse a la diferente altitud en la que se llevó a cabo el experimento: 2.800 msnm el de Abdalla *et al.* (2016) vs 3.659 msnm del presente estudio, en cuyo caso el ambiente hipóxico y su impacto sobre el diámetro tubular seminífero sería menor. En cambio, al día 60, si bien se observa que los grupos expuestos a altura presentaron mayores diámetros tubulares, el grupo BA presenta un diámetro similar al exhibido el día 0, lo que sugiere una recuperación del diámetro tubular afectado al día 30. Contrariamente, el grupo AA mantiene un diámetro similar al del día 30. Los menores diámetros presentados por BAV y AAV durante el día 60, con respecto a BA y AA, estarían relacionados con las menores alturas epiteliales registradas en el presente estudio.

En el día 120 se observó que, tanto para el diámetro tubular como la altura del epitelio seminífero, no hay diferencias significativas entre los grupos expuestos a la altura, además de una recuperación del diámetro y la altura epitelial en todos los grupos. Sin embargo, en el día 180 los grupos nativos de baja altura presentaron menores promedios para estas variables que los nativos de altura, lo que podría estar relacionado con los efectos de la estacionalidad sobre el epitelio germinal del carnero, lo que también explicaría la ausencia del efecto de la administración de vitaminas. Varios estudios realizados en carneros han reportado resultados similares, donde se muestra que durante la temporada no reproductiva hay una disminución importante en los diámetros tubulares seminíferos (Mortimer y Lincoln, 1982; Hochereau-de Reviers *et al.*, 1985; Gastel *et al.*, 1995; Bielli *et al.*, 1997).

Interesantemente, en este estudio se han manifestado aparentes efectos estacionales en los carneros nativos de baja altura sobre las poblaciones celulares y el epitelio germinal del túbulo seminífero. Sin embargo, estas

variaciones estacionales no fueron detectadas en los carneros nativos de altura. Esto, probablemente, podría relacionarse con diferencias en el tipo de manejo o ser una estrategia de adaptación reproductiva del ovino de altura que reduciría la estacionalidad para compensar su deficiente capacidad reproductiva (Monge, 1942; Monge y Mori-Chavez, 1942; Monge *et al.*, 1945; Parraguez *et al.*, 2005). Además, esto permitiría un mejor aprovechamiento de la disponibilidad de pradera del altiplano andino (entre diciembre y febrero) (De Carolis, 1987), la cual no sería posible con una estacionalidad reproductiva marcada, donde las hembras parirían, según latitud, entre abril y octubre.

Al analizar la morfología espermática de los eyaculados de carnero se observó que solamente los carneros expuestos de forma aguda a la altura presentaron un porcentaje de alteraciones espermáticas comparativamente mayor que el resto de los grupos, lo que se manifiesta hasta el día 60. Esto podría indicar que la exposición aguda a HH tendría un efecto negativo sobre la morfología espermática, ya que alteraría la diferenciación durante la espermiogénesis y las etapas meióticas tardías (Bustos-Obregón *et al.*, 2006). A pesar de que estudios realizados en ratones en cámaras hipobáricas (Bustos-Obregón *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2011) y humanos expuestos a la altura (Okumura *et al.*, 2003; Verrati *et al.*, 2008) presentaron resultados similares, el porcentaje de anormalidades presentes en nuestro estudio es mucho menor. Por otra parte, un estudio realizado por Awad *et al.* (2015) en carneros y cabras expuestos a una altura moderada (1800 msnm), no reportó diferencias significativas en cuanto al porcentaje de anormalidades espermáticas. Estas diferencias podrían deberse a que la altura moderada a la que fueron expuestas los animales es acompañada por una HH moderada, que no es suficiente como para manifestar alteraciones morfológicas en los espermatozoides. Otra posible explicación es que, al no especificar en el estudio cuánto tiempo estuvieron los animales expuestos a la altura, es que los animales hayan sufrido previamente un proceso de aclimatación, lo cual sería similar a lo que observamos en nuestro

estudio a partir del día 120, donde no se observaron diferencias entre los grupos respecto al porcentaje de alteraciones espermáticas presentes en sus eyaculados. Cabe mencionar que el bajo porcentaje de anomalías espermáticas observadas en todos los grupos y durante todo el transcurso de este experimento (menos del 15%) sería considerado normal en el carnero (Barth y Oko, 1989; Pugh, 2002) y, por lo tanto, no afectaría su fertilidad.

Información acerca del estatus antioxidante del plasma seminal en individuos expuestos a gran altura, representada por los biomarcadores GPx, SOD y TAC, se encuentra escasamente disponible en la literatura. En este estudio se observó una menor actividad de GPx y SOD en los grupos de carneros expuestos a la altura que en los grupos control durante toda la duración del experimento, lo que sugiere que la HH altera y disminuye la actividad enzimática antioxidante. La menor actividad de SOD podría originarse debido a un efecto inhibitorio causado por altas concentraciones de H_2O_2 , como consecuencia de la producción de EROs inducida por la HH (Maiti *et al.*, 2006). Resultados similares en diferentes tejidos se han reportado en diversos estudios realizados con humanos y ratas expuestos a condiciones de gran altura natural o artificial (Maiti *et al.*, 2006; Dosek *et al.*, 2007; Zepeda *et al.*, 2012). Por otro lado, al día 60 y 120 el grupo BA presentó la menor TAC entre los grupos, lo que indica que la exposición aguda a la altura también puede afectar las defensas antioxidantes no enzimáticas. En estudios realizados a nivel del mar se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la TAC, la actividad GPx y SOD, presentes en el plasma seminal y la calidad del semen en el hombre (Khosrowbeygi *et al.*, 2004) y el carnero (Cofre *et al.*, 2016), siendo la SOD y la GPx enzimas con un rol protector crucial contra las EROs en el semen de carnerillos (Kasimanickam *et al.*, 2006).

8. CONCLUSIÓN

La exposición a HH en carneros no adaptados a la altura reduce, en el corto plazo (30 días), las poblaciones celulares presentes en el epitelio seminífero, la altura epitelial, el diámetro tubular, la capacidad antioxidante total e incrementa el porcentaje de anormalidades espermáticas. Por otro lado, las defensas antioxidantes enzimáticas (actividad GPx y SOD) del plasma seminal disminuyen en respuesta a la exposición a la altura, tanto aguda como crónica.

La suplementación oral con vitaminas C y E evita y/o amortigua la reducción de la población de espermatogonias, la reducción de la altura del epitelio seminífero y el diámetro tubular, la disminución de la capacidad antioxidante total y reduce el grado de arresto espermatogénico al día 30 en carneros adaptados de forma aguda a la altura.

Existe una absorción importante de vitaminas C y E administradas oralmente, que llegan al plasma sanguíneo de los carneros.

Se percibe un efecto estacional sobre el epitelio germinal y las poblaciones celulares presentes en carneros no adaptados a la altura. Sin embargo, este efecto estacional no estaría presente en los carneros nativos de altura.

Los resultados de este estudio confirman que la suplementación con vitaminas antioxidantes favorece la espermatogénesis y la capacidad antioxidante total del plasma seminal de carneros no adaptados a la altura en el corto plazo. Sin embargo, no tienen efectos importantes sobre las alteraciones morfológicas espermáticas y las enzimas presentes en el plasma seminal en carneros expuestos a gran altura por corto y largo tiempo.

9. REFERENCIAS

9.1. Bibliografía.

- **ABDALLA, A.M.; TINGARI, M.D.; ALI, K.Z.; REZIGALLA, A.A.; AL-SHRAIM, M.; EID, R. 2016.** Reversible Effect of High Altitude on Rat Testis Morphology and Spermatogenesis: Histological and Ultrastructural Study. *International Journal of Morphology* 34(1):153-159.
- **AGARWAL, A.; SEKHON, L.H. 2010.** The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. *Human Fertility* 13(4):217-225.
- **AHMED, E.A.; DE ROOIJ, D.G. 2009.** Staging of Mouse Seminiferous Tubule Cross-Sections. **In:** Keenye, S. (Ed.). Meiosis: Volume 2, Cytological Methods. Humana Press. New York, USA. pp. 263-277.
- **ANGULO, C.; MALDONADO, R.; PULGAR, E.; MANCILLA, H.; CÓRDOVA, A.; VILLARROEL, F.; CASTRO, M.; CONCHA, I. 2011.** Vitamin C and oxidative stress in the seminiferous epithelium. *Biological Research* 44(2):169-180.
- **ASKEW, E.W. 2002.** Work at high altitude and oxidative stress: antioxidants nutrients. *Toxicology* 180(2):107-119.
- **AWAD, N.S.; SOLIMAN, M.M.; MOHAMED, A.A.; SABRY, A.M.; SHAHABY, A.F.; EI-TARRAS, A.E. 2015.** Effect of altitude on some male fertility related traits in Saudi ovine and caprine species. *Annals of Animal Science* 15(3):641-653.
- **BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. 2008.** Oxidative stress alters membrane sulfhydryl status and phospholipid contents of crossbreed cattle bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 104(2):398-404.
- **BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. 2009.** Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress. *Animal Science Papers and Reports* 27(1):5-14.
- **BARRY, J.S.; ANTHONY, R.V. 2008.** The pregnant sheep as a model for human pregnancy. *Theriogenology* 69(1):55-67.
- **BARTH, A.D.; OKO, R.J. 1989.** Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa University Press. Ames, Iowa, USA. 285 p.

- **BAYLEY, D.M.; DAVIES, B.; YOUNG, I.S.; HULLIN, D.A.; SEDDON, P.S. 2001.** A potential role for free radical-mediated skeletal muscle soreness in the pathophysiology of acute mountain sickness. *Aviation, Space, Environmental Medicine* 72(6):513-521.
- **BEALL, C.M. 2007.** Two routes to functional adaptation: Tibetan and andean high-altitude natives. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104[suppl 1]:8655-8660.
- **BENÍTEZ ZEQUEIRA, D.E. 2006.** Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: Defensa ante el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 25(2):0-0.
- **BIELLI, A.; GASTEL, T.; PÉREZ, R.; LÓPEZ, A.; CASTRILLEJO, A.; REGUEIRO, M.; FORSBERG, M.; LUNDEHEIM, N.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1997.** Influence of nutrition on seasonal variations in testicular morphology and function in Corriedale rams. *Journal of Reproduction and Development* 43(2):171-180.
- **BLOM, E.; BIRCH-ANDERSEN, A. 1965.** The ultrastructure of a new hereditary sterilizing defect (the 'Dag defect') in the bull sperm tail. *Animal Breeding Abstracts* 35(1): 309.
- **BUSTOS-OBREGÓN, E.; ESVEILE, C.; CONTRERAS, J.; MAURER, I.; SARABIA, L. 2006.** Effects of chronic simulated hypobaric hypoxia on mouse spermatogenesis. *International Journal of Morphology* 24(3):481-488.
- **BUSTOS-OBREGÓN, E.; CASTRO-SÁNCHEZ, R.; RAMOS-GONZÁLEZ, B.; TORRES-DÍA, L. 2010.** Rat Spermatogenesis Damage in Intermittent Hypobaric Hypoxia and the Protective Role of Melatonin. II: Testicular Parameters. *International Journal of Morphology* 28(2):537-547.
- **CLARK, T.A.; LEE, H.P.; ROLSTON, R.K.; ZHU, X.; MARLATT, M.W.; CASTELLANI, R.J.; NUNOMURA, A.; CASADESUS, G.; SMITH, M.A.; LEE, H.G. 2010.** Oxidative stress and its implications for future treatments and management of alzheimer disease. *International Journal of Biomedical Science: IJBS* 6(3):225.
- **COFRÉ-NARBONA, E.J.; PERALTA-TRONCOSO, O.A.; URQUIETA-MANGIOLA, B.E.; RAGGI-SAINI, L.A.; BENAVIDES-ÁGUILA, N.; PARRAGUEZ-GAMBOA, V.H. 2016.** Mejoramiento del estatus antioxidante y de la calidad del semen por suplementación oral con vitaminas C y E en carneros. *Revista Científica, FCV-LUZ* 26(3):156-163.

- **COOPER, T.G. 2005.** Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Human Reproduction* 20(1):9-11.
- **CÓRDOVA-IZQUIERDO, A.; RUIZ LANG, C.G.; CÓRDOVA-JIMÉNEZ, C.A.; CÓRDOVA-JIMÉNEZ, M.S.; GUERRA LIERA, J.E.; RODRIGUEZ DENIS, B.E.; ARANCIBIA SALINAS, K. 2009.** Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 3(1):1-38.
- **CÓRDOVA-IZQUIERDO, A.; OAXACA, J.A.S.; LANG, G.R.; CAMPOS, V.M.X.; SUÁREZ, S.C.; BETANCOURT, S.D.P.; CÓRDOVA-JIMÉNEZ, C.A.; CÓRDOVA-JIMÉNEZ, M.S.; MENDOZA, M.M.; HUERTA, C.R. 2010.** Estrés oxidativo en gametos. *REDVET Revista Electrónica de Veterinaria* 11(7):1-32.
- **DE CAROLIS, G.D. 1987.** Descripción del sistema ganadero y hábitos alimentarios de camélidos domésticos y ovinos en el bofedal de parinacota. Tesis para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. 216 p.
- **DOSEK, A.; OHNO, H.; ACS, Z.; TAYLOR, A.W.; RADAK, Z. 2007.** High altitude and oxidative stress. *Respiration and Physiology and Neurobiology* 158(2-3):128-131.
- **ECHTAY, K.S.; ESTEVES, T.C.; PAKAY, J.L.; JEKABSONS, M.B.; LAMBERT, A.J.; PORTERO-OTÍN, M.; PAMPLONA, R.; VIDAL-PUIG, A.J.; WANG, S.; ROEBUCK, S.J.; BRAND, M.D. 2003.** A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *The EMBO Journal* 22(16):4103-4110.
- **EGHBALI, M.; ALVI-SHOUSHTARI, S.M.; REZAI, S.A. 2008.** Effects of copper and superoxide dismutase content of seminal plasma on buffalo semen characteristics. *Pakistan Journal of Biology Science: PJBS* 11(15):1964-1968.
- **FARIAS, J.; BUSTOS-OBREGÓN, E.; ORELLANA, R.; BUCAREY, J.; QUIROZ, E.; REYES, J. 2005a.** Effects of chronic hypobaric hypoxia on testis histology and round spermatid oxidative metabolism. *Andrologia* 37(1):47-52.
- **FARIAS, J.G.; BUSTOS-OBREGON, E.; REYES, J.G. 2005b.** Increase in testicular temperature and vascularization induced by hypobaric hypoxia in rats. *Journal of Andrology* 26(6):693-697.
- **FARIAS, J.G.; BUSTOS-OBREGON, E.; TAPIA, P.J.; GUTIÉRREZ, E.; ZEPEDA, A.; JUANTOK, C.; CRUZ, G.; SOTO, G.; BENITES, J.;**

- REYES, J.G. 2008.** Time course of endocrine changes in the hypophysis-gonad axis induced by hypobaric hypoxia in male rats. *Journal of Reproduction and Development* 54(1):18-21.
- **FARIAS, J.G.; PUEBLA, M.; ACEVEDO, A.; TAPIA, P.J.; GUTIERREZ, E.; ZEPEDA, A.; CALAF, G.; JUANTOK, C.; REYES, J.G. 2010.** Oxidative stress in rat testis and epididymis under intermittent hypobaric hypoxia: Protective role of ascorbate supplementation. *Journal of Andrology* 31(3):314-321.
 - **FERRARA, N. 2009.** Vascular endothelial growth factor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29(6):789-791.
 - **FRAGA, C.G.; MOTCHNIK, P.A.; SHIGENAGA, M.K.; HELBOCK, H.J.; JACOB, R.A.; AMES, B.N. 1991.** Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88(24):11003-11006.
 - **GADEA, J.; MOLLA, M.; SELLES, E.; MARCO, M.; GARCIA-VAZQUEZ, F.; GARDON, J. 2011.** Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 62(1):40-46.
 - **GASTEL, T.; BIELLI, A.; PEREZ, R.; LOPEZ, A.; CASTRILLEJO, A.; TAGLE, R.; FRANCO, J.; LABORDE, D.; FORSBERG, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. 1995.** Seasonal variations in testicular morphology in Uruguayan Corriedale rams. *Animal Reproduction Science* 40(1):59-75.
 - **GAT, Y.; GORNISH, M.; NAVON, U.; CHAKRABORTY, J.; BACHAR, G.N.; BBEN-SHLOMO, I. 2006.** Right varicocele and hypoxia, crucial factors in male infertility: fluid mechanics analysis of the impaired testicular drainage system. *Reproductive BioMedicine Online* 13(4):510-515.
 - **GAT, Y.; GORNISH, M.; PERLOW, A.; CHAKRABORTY, J.; LEVINGER, U.; BEN-SHLOMO, I.; PASQUALOTTO, F. 2010.** Azoospermia and sertoli-cell-only syndrome: Hypoxia in the sperm production site due to impairment in venous drainage of male reproductive system. *Andrologia* 42(5):314-321.

- **GOMEZ, E.; BUCKINGHAM, D.W.; LANZAFAME, F.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. 1996.** Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *Journal of Andrology* 17(3):276-87.
- **GONZALEZ, C.; SANZ-ALFAYATE, G.; AGAPITO, M.T.; GOMEZ-NIÑO, A.; ROCHER, A.; OBESO, A. 2002.** Significance of ROS in oxygen sensing in cell systems with sensitivity to physiological hypoxia. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 132(1):17-41.
- **GONZALES, G.F. 2007.** Peruvian contributions to the study on human reproduction at high altitude: From the chronicles of the spanish conquest to the present. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 158(2):172-179.
- **GRECO, E.; JACOBELLI, M.; RIENZI, L.; UBAIDI, F.; FERRERO, S.; TESARIK, J. 2005.** Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *Journal of Andrology* 26(3):349-353.
- **GUVEN, A.; ICKIN, M.; UZUN, O.; BAKAR, C.; GULEC BALBAY, E.; BALBAY, O. 2014.** Erdosteine protects rat testis tissue from hypoxic injury by reducing apoptotic cell death. *Andrologia* 46(1):50-58.
- **HARTLEY, R.; CASTRO-SÁNCHEZ, R.; RAMOS-GONZALEZ, B.; BUSTOS-OBREGÓN, E. 2009.** Rat spermatogenesis damage in intermittent hypobaric hypoxia and the protective role of melatonin. I Cauda epididymal spermatozoa. *International Journal of Morphology* 27(4):1275-1284.
- **HERNÁNDEZ-MATOS, Y.; DELGADO-ROCHE, L.; LÓPEZ-PÉREZ, R.; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G.; MALLOK, A. 2010.** Impacto de las especies reactivas del oxígeno sobre la fertilidad masculina. *Revista de Endocrinología y Nutrición* 18(3):153-158.
- **HIDIROGLOU, M. 1999.** Forms and route of vitamin C supplementation for cows. *Journal of dairy science* 82(8):1831-1833.
- **HOLT, W.V. 1982.** Epididymal origin of a coiled-tail sperm defect in a boar. *Journal of Reproduction and Fertility* 64(2):485-489.
- **HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; PERREAU, C.; LINCOLN, G.A. 1985.** Photoperiodic variations of somatic and germ cell populations in the Soay ram testis. *Journal of Reproduction and Fertility* 74(2):329-334.

- **HUDDLESTON, B.; ATAMAN, E.; DE SALVO, P.; ZANETTI, M.; BLOISE, M.; BEL, J.; FRANCESCHINI, G.; FE D'OSTIANI, L. 2003.** Towards a GIS-based analysis of mountain environments and populations. *Environment and Natural Resources Working Paper (FAO)*.
- **ILAVAZHAGAN, G.; BANSAL, A.; PRASAD, D.; THOMAS, P.; SHARMA, S.; KAIN, A.; KUMAR, D.; SELVAMURTHY, W. 2001.** Effect of vitamin e supplementation on hypoxia-induced oxidative damage in male albino rats. *Aviation, Space, Environmental Medicine* 72(10):899-903.
- **ILLIUS, A. W.; HAYNES, N. B.; LAMMING, G. E. 1976.** Effects of ewe proximity on peripheral plasma testosterone levels and behaviour in the ram. *Journal of reproduction and fertility* 48(1):25-32.
- **ILLIUS, A. W., MARX, S.P.; HAYNES, N.B.; LAMMING, G.E. 1975.** The effect of ewe proximity on testis size in developing rams. *Veterinary Record* 97(15):281-282.
- **INFOSTAT. 2016.** InfoStat versión 2016. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- **ISLAM, A.B.M.; LAND, R.B. 1977.** Seasonal variations in testis diameter and sperm output of rams of breeds of different prolificacy. *Animal Production* 25(3):311-317.
- **IZQUIERDO, A.C.; JIMÉNEZ, M.S.C.; LANG, C.G.R.; JIMÉNEZ, C.A.C.; LIERA, J.E.G.; DENIS, B.E.R.; SALINAS, K.A. 2009.** Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 3(1):1-38.
- **JAFAROGHLI, M.; ABDI-BENEMAR, H.; ZAMIRI, M.; KHALILI, B.; FARSHAD, A.; SHADPARVAR, A. 2014.** Effects of dietary n- 3 fatty acids and vitamin c on semen characteristics, lipid composition of sperm and blood metabolites in fat-tailed moghani rams. *Animal Reproduction Science* 147(1):17-24.
- **JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. 1979.** Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility* 31(5):531-537.

- **KASIMANICKAM, R.; PELZER, K.D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W.S.; TATCHER, C.D. 2006.** Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. *Theriogenology* 65(7):1407-1421.
- **KEHRER, J.P.; LUND, L.G. 1994.** Cellular reducing equivalents and oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 17(1):65-75.
- **KHOSROWBEYGI, A.; NOSRATOLLAH, M.S.; DELDAR, Y. 2004.** Correlation between sperm quality parameters and seminal plasma antioxidants status. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2(2):58-64.
- **KNIGHT, C.; DUTCHER, R.; GUERRANT, N.; BECHDEL, S. 1940.** Destruction of ascorbic acid in the rumen of the dairy cow. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 44(1):90-93.
- **LIAO, W.; CAI, M.; CHEN, J.; HUANG, J.; LIU, F.; JIANG, C.; GAO, Y. 2010.** Hypobaric hypoxia causes deleterious effects on spermatogenesis in rats. *Reproduction* 139(6):1031-1038.
- **LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; PÉREZ-LLANO, B.; GARCÍA-CASADO, P.; SALA, R.; GOSÁLBEZ, A.; ARROYO, F.; FERNÁNDEZ, J.L.; GOSÁLVEZ, J. 2008.** Sperm DNA fragmentation in a random sample of the Spanish boar livestock. *Animal Reproduction Science* 103(1):87-98.
- **LUO, H.; JIA, Z.; ZHU, S.; DING, J. 2004.** Effect of vitamin e on the qualities of fresh and frozen-thawed ram semen. *China Herbivores* (5):14-16.
- **MAGALHAES, J.; ASCENSAO, A.; MARQUES, F.; SOARES, J.M.; FERREIRA, R.; NEUPARTH, M.J.; DUARTE, J.A. 2005.** Effect of a high-altitude expedition to a himalayan peak (pumori, 7,161 m) on plasma and erythrocyte antioxidant profile. *European Journal of Applied Physiology* 93(5-6):726-732.
- **MAITI, P.; SINGH, S.B.; SHARMA, A.K.; MUTHURAJU, S.; BANERJEE, P.K.; ILAVAZHAGAN, G. 2006.** Hypobaric Hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochemistry International* 49(8):709-716.
- **MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. 2009.** Oxidative stress & male infertility. *Indian Journal of Medical Research* 129(4):357–367.
- **MANN, T. 1964.** The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract. 2nd ed. Methuen. London, U.K. 493 p.

- **MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. 1981.** Male Reproductive Function and Semen. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 495p.
- **MARTI, E.; MARTI, J.I.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. 2008.** Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzyme activity in ram spermatozoa. *Journal of Andrology* 29(4):459-467.
- **MASON, K.E.; MAUER, S.I. 1975.** Reversible testis injury in the vitamin E-deficient hamster. *Journal of Nutrition* 105(4):484-493.
- **MATTHEWS, N.; BESTER, N.; SCHWALBACH, L.M.J. 2003.** A Comparison of ram semen collected by artificial vagina and electroejaculation. *SA Journal of Animal Science* 4(1):28-30.
- **MILANI, P.; GAGLIARDI, S.; COVA, E.; CEREDA, C. 2011.** SOD1 transcriptional and posttranscriptional regulation and its potential implications in ALS. *Neurology Research International* 2011:1-9.
- **MINUTOLI, L.; ARENA, S.; BONVISSUTO, G.; BITTO, A.; POLITO, F.; IRRERA, N.; ARENA, F.; FRAGALÁ, E.; ROMEO, C.; NICOTINA, P.A.; FAZZARI, C.; MARINI, H.; IMPLATINI, A.; GRIMALDI, S.; CANTONE, N.; DI BENEDETTO, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; MORGIA, G. 2011.** Activation of adenosine A_{2A} receptors by polydeoxyribonucleotide increases vascular endothelial growth factor and protects against testicular damage induced by experimental varicocele in rats. *Fertility and Sterility* 95(4):1510-1513.
- **MOHANRAJ, P.; MEROLA, A.J.; WRIGHT, V.P.; CLANTON, T.L. 1998.** Antioxidants protect rat diaphragmatic muscle function under hypoxic conditions. *Journal of Applied Physiology* 84(6):1960-1966.
- **MONGE, M.C. 1942.** Fisiología de la reproducción en la altura. Aplicaciones a la industria animal. *Anales de la Facultad de Medicina* 25(1):19-33.
- **MONGE, M.C.; MORI-CHAVEZ, P. 1942.** Fisiología de la reproducción en la altura. *Anales de la Facultad de Medicina* 25(1):34-40.
- **MONGE, M.C.; SAN MARTÍN, M.; ATKINS, J.; CASTAÑON, J. 1945.** Aclimatación del Ganado ovino en las grandes alturas. *Anales de la Facultad de Medicina* 28(1):15-31.

- **MORENO, R.D.; REYES, J.G.; FARIÁS, J.G.; PARADA-BUSTAMANTE, A.A.; AGUIRRE, V.; ZEPEDA, A.B.; FIGUEROA, C.A.; PINO, J.A. 2012.** Spermatogenesis at the extreme: Oxidative stress as a converging mechanism of testicular damage due to pathological and environmental exposure. **In:** Nemoto, Y.; Inaba, N. (Eds.) *Testis: Anatomy, Physiology and Pathology*. Nova Science Publishers. EEUU. pp. 1-42.
- **MORTIMER, D.; LINCOLN, G.A. 1982.** Ultrastructural study of regressed and reactivated testes from Soay rams. *Journal of Reproduction and Fertility* 64(2):437-442.
- **MURATORI, M.; PIOMBONI, P.; BALDI, E.; FILIMBERTI, E.; PECCHIOLI, P.; MORETTI, E.; MAGGI, M. 2000.** Functional and ultrastructural features of DNA-fragmented human sperm. *Journal of Andrology* 21(6):903-912.
- **NARBONA, E. 2018.** Efectos del estrés oxidativo causado por la hipoxia y de la terapia antioxidante en la función reproductiva de carneros mantenidos en la altura. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias. Santiago, Chile. Universidad de Chile, 87 p.
- **NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 1985.** Nutrient Requirements of Sheep. National Academy of Sciences. Subcommittee on Sheep Nutrition. Committee on Animal Nutrition. Washington DC, USA. 112 p.
- **NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. 2007.** Nutrient Requirements of Small Ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. National Academy of Sciences. Committee on Nutrients Requirements of Small Ruminants. Washington DC, USA. 362 p.
- **OKUMURA, A.; FUSE, H.; KAWAUCHI, Y.; MIZUNO, I.; AKASHI, T. 2003.** Changes in male reproductive function after high altitude mountaineering. *High Altitude Medicine & Biology* 4(3):349-353.
- **PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, M.; DÍAZ, R.; BRUZZONE, M.E.; BEHN, C.; RAGGI, L.A. 2005.** Effect of hypobaric hypoxia on lamb intrauterine growth: Comparison between high-and low-altitude native ewes. *Reproduction, Fertility and Development* 17(5):497-505.

- **PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, M.A.; URQUIETA, B.; GALLEGUILLOS, M.; DE LOS REYES, M.; KOOYMAN, D.L.; ARANEDA, S.; RAGGI, L.A. 2010.** Expression of vascular endothelial growth factor and endothelial nitric oxide synthase is increased in the placenta of sheep at high altitude in the andes. *Canadian Journal of Veterinary Research* 74(3):193-199.
- **PARRAGUEZ, V.H.; ATLAGICH, M.; ARANEDA, O.; GARCIA, 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. *Reproduction, Fertility and Development* 23(2):285-296.
- **PONCE DE LEON, C. 2014.** Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática en ratón. Trabajo fin de grado en Biología. Jaén, Andalucía, España. Universidad de Jaén, Fac. Cs. Experimentales. 40 p.
- **PUGH, D.G. 2002.** Sheep & Goat Medicine. W.B. Saunders. Philadelphia, Pennsylvania, USA. 455 p.
- **RAO, B.; SOUFIR, J.C.; MARTIN, M.; DAVID, G. 1989.** Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Research* 24(2):127-134.
- **RICHALET, J.P.; DONOSO, M.V.; JIMENEZ, D.; ANTEZANA, A.M.; HUDSON, C.; CORTES, G.; OSORIO, J.; LEON, A. 2002.** Chilean miner s commuting from sea level to 4500 m: a perspective study. *High Altitude Medicine & Biology* 3(2):159-166.
- **ROCK, C.L.; JACOB, R.A.; BOWEN, P.E. 1996.** Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: Vitamin c, vitamin e, and the carotenoids. *Journal of the American Dietetic Association* 96(7):693-702.
- **ROLF, C.; COOPER, T.; YEUNG, C.; NIESCHLAG, E. 1999.** Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin c and vitamin e: A randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Human Reproduction* 14(4):1028-1033.
- **ROSS, C.; MORRISS, A.; KHAIRY, M.; KHALAF, Y.; BRAUDE, P.; COOMARASAMY, A.; EL-TOUKHY, T. 2010.** A systematic review of the effect of oral antioxidants on male infertility. *Reproductive BioMedicine Online* 20(6):711-723.

- **SARASWAT, S.; KHARCHE, S.; JINDAL, S. 2014.** Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: A balancing act between beneficial and detrimental effects. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 4(2):247-255.
- **SARLOS, P.; MOLNAR, A.; KOKAI, M. 2002.** Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Veterinaria Hungarica* 50(2):235-245.
- **SHEVANTAIEVA, O.; KOSYUGA, Y.I. 2006.** Effect of acute hypobaric hypoxia on spermatogenesis and lactate concentration in testicular tissue of male albino rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 141(1):20-22.
- **SORENSEN, A.M. 1991.** Reproducción animal. Principios y Prácticas. McGraw – Hill. México DF, Mexico. 539 p.
- **SORG, O. 2004.** Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies* 327(7):649-662.
- **TEOH-FITZGERALD, M.L.; FITZGERALD, M.P.; JENSEN, T.J.; FUTSCHER, B.W.; DOMANN, F.E. 2012.** Genetic and epigenetic inactivation of extracellular superoxide dismutase promotes an invasive phenotype in human lung cancer by disrupting ECM homeostasis. *Molecular Cancer Research* 10(1):40-51.
- **THIELE, J.J.; FREISLEBEN, H.J.; FUCHS, J.; OCHSENDORF, F.R. 1995.** Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Human Reproduction* 10(1):110-115.
- **UGARTONDO CASADEVALL, V. 2009.** Caracterización de derivados polifenólicos obtenidos de fuentes naturales. Citotoxicidad y capacidad antioxidante frente a estrés oxidativo en modelos celulares. Tesis Doctorado en Medicamentos, Alimentación y Salud. Barcelona, España. Universitat de Barcelona, Facultat de Farmàcia, Departament de Físicoquímica. 238 p.
- **VARGAS, A.; BUSTOS-OBREGÓN, E.; HARTLEY, R. 2011.** Effects of hypoxia on epididymal sperm parameters and protective role of ibuprofen and melatonin. *Biological Research* 44(2):161-167.
- **VERRATTI, V.; BERARDINELLI, F.; DI GIULIO, C.; BOSCO, G.; CACCHIO, M.; PELLICCIOTTA, M.; NICOLAI, M.; MARTINOTTI, S.; TENAGLIA, R. 2008.** Evidence that chronic hypoxia causes reversible impairment on male fertility. *Asian Journal of Andrology* 10(4):602-606.

- **WANG, X.; SHARMA, R.K.; SIKKA, S.C.; THOMAS, A.J.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. 2003.** Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertility and Sterility* 80(3):531-535.
- **WROBEL, K.H.; REICHOLD, J.; SCHIMEL, M. 1995.** Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger* 177(1):19-32.
- **YEUNG, C.H.; TÛTTELMANN, F.; BERGMANN, M.; NORDHOFF, V.; VORONA, E.; COOPER, T.G. 2009.** Coiled sperm from infertile patients: characteristics, associated factors and biological implication. *Human Reproduction* 24(6):1288-1295.
- **YUE, D.; YAN, L.; LUO, H.; XU, X.; JIN, X. 2010.** Effect of vitamin e supplementation on semen quality and the testicular cell membranal and mitochondrial antioxidant abilities in aohan fine-wool sheep. *Animal Reproduction Science* 118(2):217-222.
- **ZEPEDA, A.B.; AGUAYO, L.G.; FUENTEALBA, J.; FIGUEROA, C.A.; SALGADO, P.K.; CALAF, G.M.; FARÍA, J.G. 2012.** Blueberry extracts protect testis from hypobaric hypoxia induced oxidative stress in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012:1-7.
- **ZUBKOVA, E.V.; ROBAIRE, B. 2004.** Effect of glutathione depletion on antioxidant enzymes in the epididymis, seminal vesicles, and liver and on spermatozoa motility in the aging brown Norway rat. *Biology of Reproduction* 71(3):1002-1008.

Anexo: Certificado de Bioética



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Comité de Bioética Animal

Santiago, 28 de junio de 2012

CERTIFICADO

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, tenida a la vista la metodología del Proyecto titulado **"Ram reproduction at high altitude. Effect of hipoxia, oxidative stress and antioxidant therapy"**, cuyo investigador principal es el Dr. **Victor Hugo Parraguez G.**, el Comité de Bioética Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile certifica que éste satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y no contraviene la legislación chilena vigente sobre la materia.

A este respecto el Comité estima que el estudio propuesto usa ovinos machos en calidad y número mínimo adecuados, obtiene material biológico de intervenciones médico veterinarias autorizadas y debidamente protocolizadas que no causan sufrimiento a los animales, y que el destino de los animales al final del experimento será su introducción a condiciones normales de crianza.

Dr. José Luis Arias B.
Director
Comité de Bioética Animal

Dr. Santiago Urcelay V.
Presidente
Comité de Bioética Animal