



Serie Proyectos de Investigación e Innovación

Superintendencia de Seguridad Social
Santiago - Chile

INFORME FINAL

USO DE UNA RESPUESTA VENTILATORIA VOLUNTARIA Y DE ANTIOXIDANTES COMO AGENTES PARA PREVENIR LA ENFERMEDAD AGUDA DE MONTAÑA EN TRABAJADORES DE ALTURA GEOGRAFICA

Autor: CLAUDIO ALLARD GARROTE
2022





SUPERINTENDENCIA DE SEGURIDAD SOCIAL

SUPERINTENDENCE OF SOCIAL SECURITY

La serie Proyectos de Investigación e Innovación corresponde a una línea de publicaciones de la Superintendencia de Seguridad Social, que tiene por objetivo divulgar los trabajos de investigación e innovación en Prevención de Accidentes y Enfermedades del Trabajo financiados por los recursos del Seguro Social de la Ley 16.744.

Los trabajos aquí publicados son los informes finales y están disponibles para su conocimiento y uso. Los contenidos, análisis y conclusiones expresados son de exclusiva responsabilidad de su(s) autor(es), y no reflejan necesariamente la opinión de la Superintendencia de Seguridad Social.

Si requiere de mayor información, sobre el estudio o proyecto escriba a: investigaciones@suseso.cl.

Si desea conocer otras publicaciones, artículos de investigación y proyectos de la Superintendencia de Seguridad Social, visite nuestro sitio web: www.suseso.cl.

The Research and Innovation Projects series corresponds to a line of publications of the Superintendence of Social Security, which aims to disseminate the research and innovation work in the Prevention of Occupational Accidents and Illnesses financed by the resources of Law Insurance 16,744.

The papers published here are the final reports and are available for your knowledge and use. The content, analysis and conclusions are solely the responsibility of the author (s), and do not necessarily reflect the opinion of the Superintendence of Social Security.

For further information, please write to: investigaciones@suseso.cl.

For other publications, research papers and projects of the Superintendence of Social Security, please visit our website: www.suseso.cl.

Superintendencia de Seguridad Social
Huérfanos 1376
Santiago, Chile.



Proyecto: USO DE UNA RESPUESTA VENTILATORIA VOLUNTARIA Y DE ANTIOXIDANTES COMO AGENTES PARA PREVENIR LA ENFERMEDAD AGUDA DE MONTAÑA EN TRABAJADORES DE ALTURA GEOGRAFICA

ACHS 223-2018

Entidad Ejecutora: UNIVERSIDAD DE ATACAMA

DIRECTOR:

**CLAUDIO ALLARD GARROTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
UNIVERSIDAD DE ATACAMA**

DIRECTOR ALTERNO:

**SEBASTIAN DRAGO PEREZ
HOSPITAL DEL TRABAJADOR
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES**

Equipo de Investigadores:

**CLAUDIA PIZARRO ROSAS
FACULTAD DE MEDICINA UNIVERSIDAD DE ATACAMA**

**FRANCISCO LEMUS ARAYA
FACULTAD DE MEDICINA UNIVERSIDAD DE ATACAMA**

**JULIO GODOY MENDOCA
FACULTAD DE MEDICINA UNIVERSIDAD DE ATACAMA**

**VICTOR HERNANDEZ BAHAMONDES
FACULTAD DE MEDICINA UNIVERSIDAD DE ATACAMA**

Fecha: 20 DE JUNIO 2022

Este trabajo fue seleccionado en la Convocatoria de Proyectos de Investigación e Innovación en Prevención de Accidentes y Enfermedades Profesionales 2018 de la Superintendencia de Seguridad Social (Chile) y fue financiado por la Asociación Chilena de Seguridad, con recursos del Seguro Social de la Ley N°16.744 de Accidentes del Trabajo y Enfermedades Profesionales.

INDICE

TÍTULO: USO DE UNA RESPUESTA VENTILATORIA VOLUNTARIA Y DE ANTIOXIDANTES COMO AGENTES PARA PREVENIR LA ENFERMEDAD AGUDA DE MONTAÑA EN TRABAJADORES DE ALTURA GEOGRAFICA

AUTORES:

**CLAUDIO ANDRES ALLARD GARROTE
SEBASTIAN REINALDO DRAGO PEREZ**

I. Resumen	4
II. Introducción y Antecedentes.....	5
III. Definición del problema, pregunta de investigación.....	9
IV. Descripción de la metodología.....	11
V. Resultados.....	13
VI. Recomendaciones para Sistema de Seguridad y Salud en el Trabajo.....	27
VII. Conclusiones.....	28
VIII. Referencias.....	29

I. Resumen

El objetivo del estudio es evaluar la efectividad de métodos alternativos en la disminución de síntomas de Enfermedad Aguda de Montaña en trabajadores expuestos a una gran altitud geográfica. Para ello, se conformaron 2 grupos: 1) grupo de intervención al que se le aplica el método de hiperventilación y 2) grupo de intervención con administración de antioxidantes. A los voluntarios del primer grupo se les evaluará los factores de riesgo de enfermedad aguda de montaña

y la respuesta ventilatoria hipóxica mediante la exposición a una condición de baja presión de oxígeno. Mediante el método de Lake Louis, se evaluará la ocurrencia de enfermedad aguda de montaña donde un puntaje igual o superior a 3 en un participante con dolor de cabeza, será considerado como el criterio para establecer si el voluntario padece o no enfermedad aguda de montaña. Al segundo grupo se les evaluará los factores de riesgo de enfermedad aguda de montaña, el estado antioxidante y el daño oxidativo. Esto se evaluará mediante muestras de sangre, tomadas antes de la exposición a una condición de baja presión de oxígeno; tras una semana después de la exposición a una gran altitud geográfica y luego de 3 semanas, las cuales corresponden a 2 semanas de faenas de altura, intercaladas por una semana de descanso donde los voluntarios fueron suplementados con antioxidantes por estas tres semanas.

II. Introducción y antecedentes

La enfermedad aguda de montaña (AMS: Acute Mountain Sickness) es un síndrome causado por la hipoxia hipobárica y que puede afectar a la gente que se expone a grandes altitudes. Los métodos de tratamiento usuales incluyen descender a bajas altitudes, uso de oxígeno y uso de medicamentos. La enfermedad aguda de montaña (EAM) o el mal agudo de montaña (MAM) representa un importante problema de salud para las personas que se exponen sobre los 2500 metros de altura sobre el nivel del mar (m.s.n.m), ya sea por actividades recreativas (deportivas, turismo, etc), o por su actividad laboral (minería, militar, entre otras). La incidencia de la EAM está determinada por diferentes variables, dentro de las cuales destaca la edad, género, susceptibilidad

individual, velocidad de ascenso, aclimatación previa y altitud a la que se expone. La incidencia ha sido estudiada en nuestro país, constatándose que en un grupo de 200 conscriptos, un 28% presenta EAM a 3500 m.s.n.m, y un 60% a los 4250 m.s.n.m (Vargas y cols, 2001). Esto se correlaciona con estudios de incidencia realizados en otras partes del mundo, en donde se ha visto una incidencia de entre 10% -15% a los 2500 m.s.n.m, y de entre 50% y 85% en personas expuestas a 4500 m.s.n.m y 5500 m.s.n.m respectivamente (Sikri G & Bhattachar S, 2016). El método más útil y seguro para evitar la prevalencia de EAM es la aclimatación. Se recomienda que sobre los 3000 metros, las personas asciendan 300 a 500 metros por día incluyendo un día de descanso cada 3-4 días. Muchas veces las personas se ven en la necesidad de subir más rápido de lo que plantea este método. Se sabe que el uso de acetazolamida y dexametasona disminuyen el riesgo de EAM y edema cerebral en estos casos, sin embargo ambos deben ser utilizados con precaución, ya que presentan efectos secundarios y podrían generar una falsa seguridad llevando a la ocurrencia de EAM severo, edema cerebral y/o edema pulmonar por ascenso muy rápido. En el último tiempo se ha descrito el alto riesgo de desarrollar la minería en altura geográfica, pues trabajadores que están expuestos sobre los 3000 m.s.n.m sufren los efectos del EAM, problemas de la calidad del sueño, diferencia significativa en el perímetro abdominal con respecto a una persona normal, describiéndose que en los centros mineros se encuentra una prevalencia mayor de estos problemas que en los reportados en la literatura (Minería Chilena, 2016; Resumen ejecutivo, 2013; Ramos M, 2015).

Chile posee grandes centros de faenas mineras sobre los 3000 m. s. n. m. como lo son: Quebrada Blanca (4200 m. s. n. m.), Salar Surire (4250 m. s. n. m.), Collahuasi (4500 m. s. n. m.), Escondida (3050 m. s. n. m.), Zaldivar (3200 m. s. n. m.), el Abra (3900 m. s. n. m.), Sociedad Chilena del Litio (3900 m. s. n. m.), SQM Salar (3900 m. s. n. m.), Carbonato de Litio SQM (3900 m. s. n. m.), Mina Can Can (3500 m. s. n. m.), Maricunga (4600 m. s. n. m.), Nevada (4800 m. s. n. m.), Los Pelambres (3200 m. s. n. m.), El indio (4100 m. s. n. m.), Andina (3100 m. s. n. m.), Los Bronces (3200 m. s. n. m.).

ESACHS es una empresa filial de la Asociación Chilena de Seguridad que cuenta con una masa importante de trabajadores en altura, que se exponen de forma aguda a condiciones de hipoxia hipobárica. De esta forma es importante para esta empresa la prevención de EAM en sus trabajadores. Al prevenir EAM se previene incidencia de malestar del trabajador y accidentes. Por otro lado la ACHS tiene empresas mineras adheridas a lo largo de Chile, varias de ellas con faenas sobre los 3.000 m. s. n. m. De esta forma es interés también de la ACHS, la búsqueda de métodos simples y prácticos para la prevención de EAM.

La EAM se define por un conjunto de síntomas y signos como: cefalea, fatiga o laxitud, pérdida del apetito, náuseas, vómitos, dificultad para dormir y respiraciones irregulares durante el sueño. Estos síntomas aparecen después de las 8 horas de exposición a altura, pudiendo aparecer incluso hasta las 96 horas. La posibilidad de desarrollar EAM depende de la susceptibilidad individual, la velocidad de ascenso, la altitud alcanzada y el tiempo de permanencia en ella (Minería Chilena, 2016; Vargas 2001). La hipoxia es el principal factor responsable de los efectos negativos de la altitud sobre la salud humana (Ramos, 2015), por lo tanto, es imperioso buscar tratamientos y metodologías para la prevención de EAM, que se puedan administrar y aplicar a trabajadores que desarrollan actividades en alturas geográficas y están sometidos a hipoxia hipobárica. Diversos estudios han demostrado que la disminución del contenido de oxígeno y aumento de dióxido de carbono a nivel cerebral, juegan un rol fundamental en la fisiopatología de la EAM. Según ellos, existen diversas condiciones fisiopatológicas determinadas por una disminución del oxígeno cerebral y un aumento del dióxido de carbono, que serían responsables de los cambios que determinan la progresión de la EAM.

En faenas, los trabajadores están expuestos a una menor presión parcial de oxígeno, lo cual limita el transporte de oxígeno a los tejidos corporales, produciendo el estado conocido como hipoxia. Recientemente se reportó que trabajadores que están en terreno, en las mineras Quebrada Blanca, Collahuasi, Andina, Escondida, Mantoverde y Centinela presentan alta prevalencia de mala calidad del sueño y mayor riesgo de presentar EAM (Minería Chilena, 2016).

En este proyecto el primer método profiláctico para prevenir la EAM busca aumentar la

biodisponibilidad de oxígeno en un individuo mediante una técnica de hiperventilación consciente.

En estudios preliminares presentados por nuestro grupo en el congreso “34th Annual Summer Meeting of the Wilderness Medical Society Colorado” en Estados Unidos, se mostró que los grupos de intervención a los cuales se les adiestró en metodologías de respuesta ventilatoria voluntaria (VVR), muestran un bajo nivel de EAM, por lo que esta técnica es efectiva para prevenir el EAM durante una ascensión de dos días. Los que presentaron EAM, sufrieron esta patología por menos tiempo cuando aplicaron la técnica de VVR. El tiempo con síntomas de EAM fue respectivamente 8,7 + 2,8 horas para el grupo control y 1,28 + 0,9 horas para el grupo de intervención ($p=0,0029$) (Drago y cols; 2017) (figura 1).

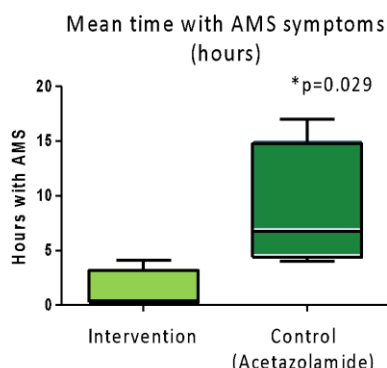


Figura 1: Horas con enfermedad aguda de montaña (AMS) en voluntarios sometidos a metodologías de VVR (intervención) y azetozolamida (figura tomada de Drago y cols 2017).

Sin embargo, este método posee limitaciones, pues los voluntarios se olvidan de aplicar la técnica de hiperventilación. Por lo anterior, es imperioso un método electrónico que permita entrenar de forma más efectiva esta técnica, a través de la monitorización de funciones respiratorias.

El segundo método profiláctico evaluado se sustenta a partir del metabolismo mitocondrial, en el cual se describe que el último receptor de electrones en el complejo IV mitocondrial es el oxígeno, el cual reduce el oxígeno a agua. Así, se espera que en una condición de hipoxia hipobárica, los electrones no serán captados por el oxígeno y por lo tanto comenzarán a producir daño oxidativo a nivel celular (figura 2). Además la célula responde a la hipoxia hipobárica y al daño oxidativo asociado a ella, incrementando los sistemas de enzimas antioxidantes (Julian C y cols 2013).

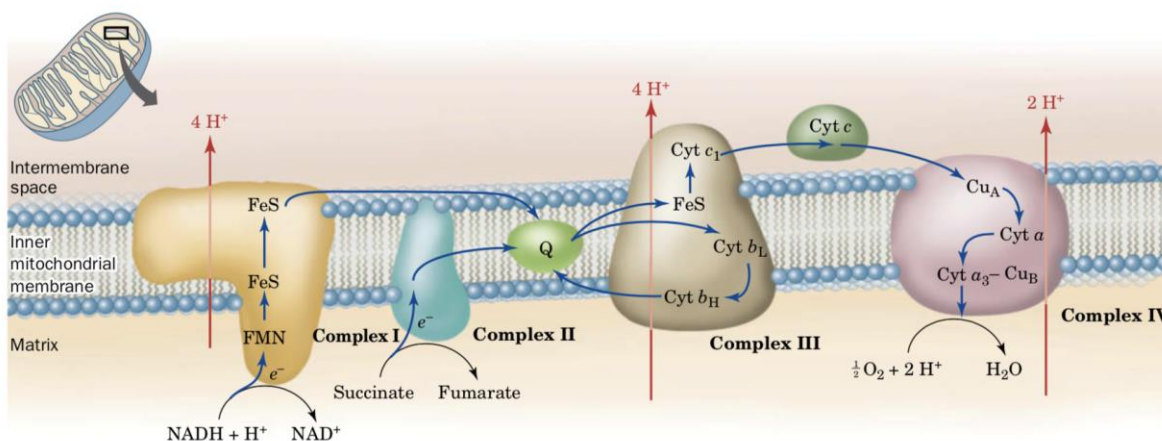


Figura 2: Complejo IV citocromo C oxidasa, de la respiración aeróbica mitocondrial. Cataliza la reducción de 4 electrones de oxígeno a agua (Voet & Voet 2016).

Estudios preliminares que avalan esta hipótesis, fueron publicados por nuestro grupo en Irarrazabal y cols en 2017, en los cuales se describe que sujetos sometidos a una hipoxia hipobárica y que padecen EAM, incrementan su daño oxidativo. Así se estableció una correlación entre la saturación de oxígeno que presentaban los individuos y la oxidación de lípidos, como también con la oxidación

de las proteínas. Existe una correlación entre la saturación de oxígeno y el puntaje de Lake-Louise (evaluación de síntomas de la EAM, que la categoriza en sin EAM, EAM leve y EAM severa) con los cambios de malondialdehído (MDA: marcador de oxidación de lípidos) que presentan individuos a una altitud de 4120 m. s. n. m. Además existe una correlación entre EAM y el daño oxidativo que padece el individuo y más aún, existe una relación entre los cambios de la saturación de oxígeno y el ritmo cardíaco durante el ascenso a 4120 m. s. n. M., con el daño oxidativo de proteínas (carbonilos) (figuras 3, 4).

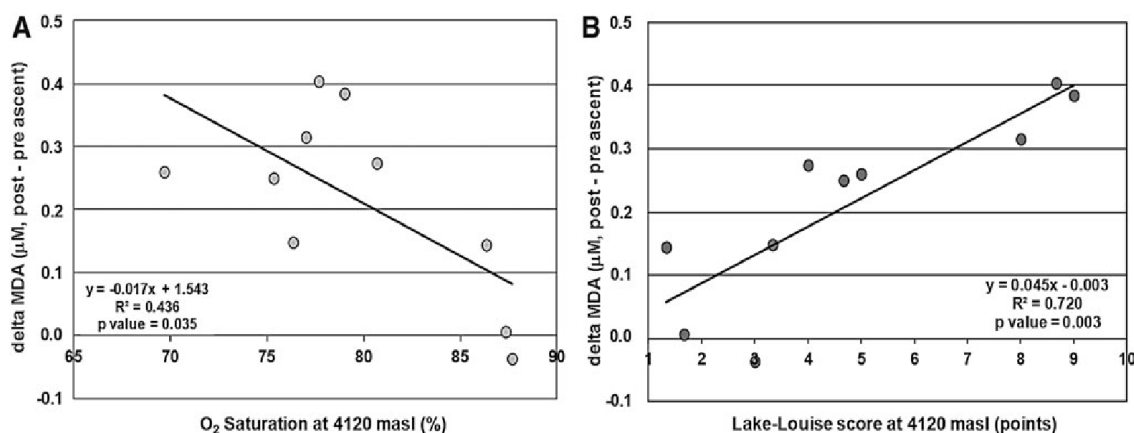


Figura 3. Correlación entre (A) saturación de oxígeno, (B) el puntaje de Lake-Louise con los cambios de MDA (malondialdehído) que presentan individuos a una altitud de 4120 m. s. n. m. El cambio de MDA plasmático se calculó mediante la diferencia entre post y pre ascensión a 4120 m. s. n. m. (Irrarrazabal y cols 2017).

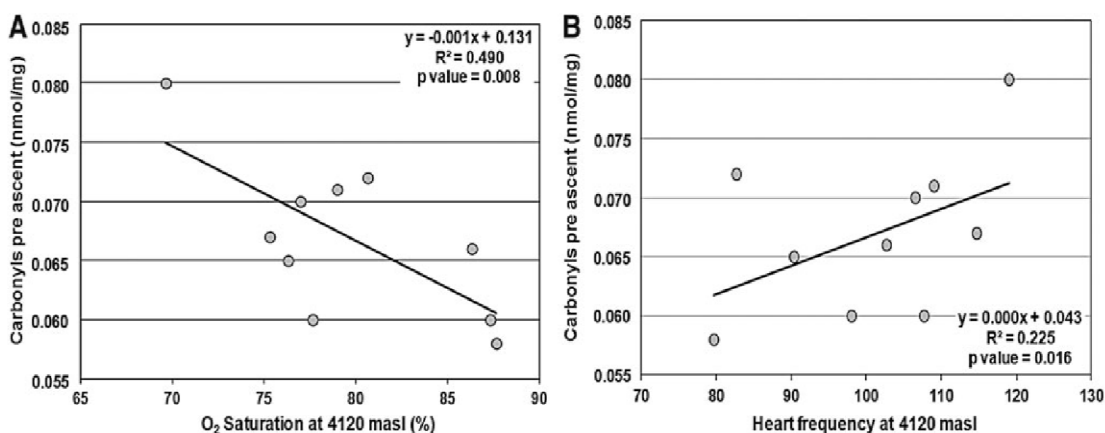


Figura 4: Relación entre los cambios de la saturación de oxígeno (A), el ritmo cardíaco (B) durante el ascenso a 4120 m. s. n. m. con el daño oxidativo de proteínas (carbonilos) (Irrarrazabal y cols 2017).

Así, el segundo método de profilaxis de EAM, podría consistir en aumentar las defensas antioxidantes en un individuo, mediante la administración de antioxidantes naturales, para prevenir el estrés oxidativo que sufre el cuerpo sometido a una condición de hipoxia hipobárica, disminuyendo la incidencia de enfermedad aguda de montaña. Por lo que se teoriza que la suplementación con antioxidantes podría prevenir el daño oxidativo asociado a la EAM. Sin embargo, se ha demostrado que una suplementación de los antioxidantes ácido alfa lipoico, beta-caroteno, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, no afecta los marcadores de estrés oxidativo en altas altitudes geográficas y no tienen efecto en el tratamiento de EAM (Baillie y cols 2009; Subudhi y cols 2004).

Por lo anterior, es necesario encontrar compuestos que no solo aumenten las defensas antioxidantes exógenas en el organismo como lo hacen los antioxidantes ácido alfa lipoico, beta-caroteno, alfa-tocoferol, ácido ascórbico sino que también puedan aumentar las defensas antioxidantes endógenas en el organismo.

Esto se puede lograr administrando antioxidantes del arándano, los cuales poseen una gran capacidad antioxidante (Cásedas y cols 2017), atenúa la disfunción endotelial inducida por

lipotoxicidad (Bharat y cols 2017) y aumenta las defensas antioxidantes endógenas, pues posee moléculas que activan a los factores de transcripción Nrf2 que aumenta las enzimas antioxidantes endógenas (Tang y cols 2018).

III. Definición del problema, pregunta de investigación

La Enfermedad Aguda de Montaña (EAM) o Mal Agudo de Montaña (MAM) representa un importante problema de salud para las personas que se exponen sobre los 2500 metros de altura ya sea por actividades recreativas (deportivas, turismo, etc), o por su actividad laboral (minería, militar, entre otras). La incidencia de la EAM está determinada por diferentes variables, dentro de las cuales destaca la edad, género, susceptibilidad individual, velocidad de ascenso, aclimatación previa y altitud a la que se expone. Chile posee grandes centros de faenas mineras sobre los 3000 m. s. n. M.; y en el último tiempo se ha descrito el alto riesgo de desarrollar la minería en altura geográfica, pues trabajadores que están expuestos sobre los 3000 m. s. n. M. sufren los efectos del EAM, como por ejemplo problemas de la calidad del sueño, lo cual los hace susceptibles a sufrir accidentes laborales.

El desempeño laboral en altura geográfica en Chile tiene características peculiares, pues induce el desplazamiento de un gran número de personas que residen habitualmente a nivel del mar. Las características geográficas de Chile, determinan que el cambio entre condiciones ambientales a nivel del mar y las de altitud, sea inusualmente rápido respecto a lo observado en otros países. Así, en sistemas de turnos especiales existe una exposición crónica intermitente a hipobaría, sin evidencia científica categórica de su impacto en la salud. Además, los trabajadores expuestos a altura tienen jornadas de trabajo excepcionales y sufren exposición a condiciones extremas de temperatura, baja humedad relativa del aire, altos niveles de radiación UV, aislamiento y contaminantes (ruido, material particulado, entre otros). Estos trabajos representan altas exigencias psicológicas, ergonómicas y la obligación de mantener condiciones físicas que les permitan adaptarse en mejor forma, disminuyendo el riesgo de presentar síntomas atribuibles a EAM.

El trabajo de altura no se limita a faenas mineras; existe una amplia gama de actividades, como el trabajo de los funcionarios públicos o faenas de construcción, que no ha sido estudiada. El método más útil y seguro para evitar la prevalencia de EAM es la aclimatación. Se recomienda que sobre los 3000 m. s. n. m., las personas asciendan 300 a 500 metros por día, incluyendo un día de descanso cada 3-4 días. Muchas veces las personas se ven en la necesidad de subir más rápido de lo que plantea este método, especialmente trabajadores de mineras de altas ubicaciones geográficas que trabajan por turnos.

Actualmente la EAM se trata mediante administración de acetazolamida y dexametasona, sin embargo ambos medicamentos presentan efectos secundarios. En el caso de acetazolamida, se

pueden producir náuseas, fatiga, alteración de sabores de bebidas carbonatadas, poliuria (con mayor riesgo de deshidratación), los cuales imitan EAM; mientras que la dexametasona altera la glicemia, la presión arterial y el estado de ánimo entre otros.

De esta forma, se hace necesario impulsar estudios colaborativos que contribuyan a dar mejores respuestas, y así tomar medidas efectivas para el resguardo de la salud de estos/as trabajadores/as. Así, el problema a resolver es:

Los trabajadores que se desempeñan en altura presentan una incidencia importante de síntomas de EAM y alteraciones del sueño. Esto genera un mayor riesgo de accidentes durante las primeras horas de exposición a altura cuando el trabajador no está aclimatado aún. Por esta razón, se debe determinar si el método de ventilación voluntaria y la administración de oxidantes de arándanos son efectivos y más eficientes para prevenir los síntomas de la EAM que los métodos utilizados actualmente.

Por consiguiente, la hipótesis de trabajo es:

“El aumento de biodisponibilidad de oxígeno y de antioxidantes del arándano previene la EAM y mejoran la aclimatación de trabajadores sometidos a hipoxia hipobárica”.

Objetivo General: Evaluar la efectividad de métodos alternativos en la disminución de síntomas de Enfermedad Aguda de Montaña o Puna (EAM), medido a través del Score de Lake Louise y la saturación de oxígeno.

Objetivos específicos:

- *Evaluar si el aumento voluntario de volumen ventilatorio y la utilización de antioxidantes de arándano disminuyen los síntomas de EAM.*
- *Evaluar si la utilización de antioxidantes de arándano aumenta las defensas antioxidantes de trabajadores expuestos a altura.*

IV. Descripción de la metodología

A. Selección de voluntarios: El cálculo de tamaño muestral se determina a partir de estudios realizados para evaluar la prevención de enfermedad aguda de montaña descritos en Lipman y cols 2012 & Moraga y cols 2007. El proyecto y el consentimiento informado fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad de Atacama.

- a) **Criterios de inclusión:** Trabajadores hombres y mujeres entre 18-60 años que realicen sus tareas laborales en compañía Minera Caserones que se encuentra a 4600 m. s. n. m. Se registrarán características de los participantes: edad, sexo, comorbilidades, IMC, grasa corporal total, antecedente de exposición previa sobre los 1500 m. s. n. m., en los 3 meses previos, historia de enfermedad aguda de montaña, altura de residencia.
- b) **Criterios de exclusión:** Presentar patología cardíaca, respiratoria o endocrina no compensada; presentar alguna enfermedad infecto contagiosa en los últimos 30 días; índice de masa corporal mayor o igual a 35; haber recibido diuréticos, corticoides, acetazolamida o anti-inflamatorios no esteroideos la semana previa al estudio; tener antecedentes de edema cerebral o pulmonar de altura; tener algún factor de riesgo cardiovascular: dislipidemia, antecedente de enfermedad cardiovascular (infarto agudo al miocardio, accidente vascular encefálico), antecedente familiar de evento cardiovascular antes de los 45 años.

B. Método de intervención 1: Respuesta ventilatoria voluntaria (VVR) para prevenir la enfermedad aguda de montaña (EAM) en trabajadores de altura geográfica

A un grupo 34 de voluntarios, luego de volver del descanso de 7 días y en el primer día de faena en la compañía Minera Caserones, los cuales trabajan en un turno de 7x7 y 4x3 (7 días en faena y 7 días de descanso ó 4 días en faena y 3 días de descanso), se les evaluó mediante el *Score de Lake Louise* y la saturación de oxígeno la EAM. Luego a los voluntarios se les entrego un oxímetro y se les enseñó cómo usarlo para que se habituaran a su uso.

En la segunda semana solo 28 voluntarios quisieron continuar a los cuales se les dio una clase expositiva acerca de la hiperventilación (VVR), cómo realizarla de manera segura, y aprender a reconocer sus efectos adversos. La VVR lo aplicarían al menos 3 veces al día, pues este no es un método invasivo y no demanda más de 40 segundos en aplicarla.

Solo 21 voluntarios fueron considerados para el estudio de VVR para prevenir la EAM, pues 6 voluntarios no pudieron ser contactados y uno no pudo asistir a faenas, por problemas médicos.

Luego de esto se evaluó luego de un mes si VVR tiene algún efecto en la EAM en trabajadores mediante el *Score de Lewis*, la saturación de oxígeno y la frecuencia de pulso (Roach RC y cols 2018 & O'Connor T y cols. 2004).

C. Método de intervención 2: uso de antioxidantes como agentes para prevenir la enfermedad aguda de montaña en trabajadores de altura geográfica

1) Elección del extracto de arándanos y medición de la capacidad antioxidante del extracto de arándano

Se procedió a buscar un extracto de arándanos que estuviera disponible en el comercio, que tuviera las siguientes características: a) facilidades para su adquisición en el comercio en grandes cantidades; b) facilidades para almacenar; c) facilidades para ser transportado a una faena minera de altura; d) que posea envase cómodo para su consumo en faena minera de altura; y e) que presentara un perfil de polifenoles, antocianinas y capacidad antioxidante elevado.

El perfil de polifenoles, antocianinas y capacidad antioxidante fue realizado en el Centro de Nutrición Molecular y Enfermedades Crónicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile mediante los métodos descritos en Waterhouse AL, 2001; Singleton y cols 1999; Ou B y cols 2001; Lee J y cols 2005.

2) Reclutamiento y evaluación

Se realizó el reclutamiento de 31 voluntarios de turno 7x7 y 3 voluntarios del turno de 4x3 (4 días en faena y 3 días de descanso). El estudio fue finalizado con 28 voluntarios (25 voluntarios del turno 7x7 y 3 voluntarios del turno 4x3). A los voluntarios se les tomaron muestras de sangre en tubos de citrato y de heparina durante tres días: a) La primera muestra de sangre (T0) fue tomada el día luego de volver del descanso; b) la segunda muestra de sangre (T1) fue tomada el día de término del turno de faena; y c) la tercera toma de muestra de sangre (T2) fue tomada luego de 3 semanas en la que los voluntarios fueron suplementados con 1 litro diario de jugo de arándanos. La administración de extractos de arándanos en faena fue realizada por la compañía Minera Caserones, la cual entregó a los trabajadores voluntarios un litro de extracto de arándanos, el cual fue consumido durante el día. En los días de descanso, la compañía Minera Caserones fue realizada por la compañía Minera Caserones entrego los extractos a los voluntarios que participan en el estudio para que los trasporten a sus hogares y lo consuman en sus hogares.

Las muestras de sangre y controles clínicos fueron tomadas en los policlínicos de Minera Caserones. Posteriormente las muestras de sangre fueron centrifugadas para aislar el plasma el cual fue almacenado a -80 °C para su posterior análisis de la capacidad antioxidante, daño oxidativo, vitamina C. Los análisis de la capacidad antioxidante, daño oxidativo, fue realizado en el Centro de Nutrición Molecular y Enfermedades Crónicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, mediante los métodos descritos en Urquiaga y cols. 2010. Además se cuantificaron los marcadores de inflamación TNF- α , IL-6 e IL10 con kit de detección de Invitrogen y de R&D Systems.

Mediante la aplicación de escala de Lake Louis, la frecuencia de pulso y la saturación de oxígeno, se evaluó la ocurrencia de enfermedad aguda de montaña (Roach RC y cols 2018 & O'Connor T y cols. 2004 & Roach RC y cols 1998).

D. Análisis estadístico:

Los datos se expresan como media \pm SD. Las medidas dentro del mismo grupo, en diferentes tiempos, se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas y prueba t pareada con ajuste de Bonferroni. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

V. Resultados

1. Respuesta ventilatoria voluntaria (VVR) para prevenir la enfermedad aguda de montaña (EAM).

a. Características de los voluntarios del estudio Respuesta ventilatoria voluntaria (VVR) para prevenir la enfermedad aguda de montaña (EAM) en trabajadores de altura geográfica.

Un total de 20 voluntarios, trabajadores de la compañía minera Caserones, fueron evaluados en el uso de VVR para prevenir EAM, los cuales trabajan en faenas sobre los 4300 m. s. n. m.

Solo el 45% de los voluntarios práctica deporte con una frecuencia de 1-2 veces a la semana.

El 15% de los voluntarios presenta síntomas respiratorios asociados a la EAM, los cuales corresponden a dificultad respiratoria en apnea del sueño.

Ningún voluntario presenta problemas cardiacos asociados a la EAM, los cuales son taquicardia, hipertensión y arritmias.

El 45% de los voluntarios presenta síntomas neurológicos asociados a la EAM, de los cuales 15 % presenta más de un problema neurológico. Los síntomas de los voluntarios que presentan un problema neurológico corresponden a:

El 22,2% presenta debilidad; el 11,1% presenta mareos; el 88,9% presenta cefalea; el 22,2% presenta inapetencia; el 33,3 % presenta somnolencia y el 11,1% presenta insomnio (Tabla 1).

Tabla 1: Características de la población de los voluntarios que participaron en VVR, que realizan faenas sobre los 4200 m. s. n. m., en minera caserones en turnos 7x7 (n=18) y en turnos 4x3 (n=2).

Edad promedio	40,5 ± 8,9 años
Tiempo promedio en faenas sobre 3000 m. s. n. m.	6,5 ± 3,4 años
% de voluntarios que practican deportes al menos una vez a la semana	45%
% de voluntarios que bebe alcohol	75%
% de los voluntarios que presenta problemas respiratorio asociados a la EAM	15%
% de los voluntarios que presenta problemas cardiacos.	0%
% de los voluntarios que presenta problemas neurológicos asociados a la EAM	45%
% de los voluntarios que presenta problemas fatiga asociados a la EAM	10%
IMC promedio	30,02 ± 2,9 Kg/m ²

b. Efecto de la Respuesta ventilatoria voluntaria (VVR) para prevenir la enfermedad aguda de montaña (EAM).

Luego de la clase expositiva acerca de la hiperventilación (VVR), y de cómo utilizarla de manera segura, se entrevistó a los 20 voluntarios que quisieron participar en la evaluación del uso de VVR.

La EAM se define como una puntuación total de Lake Louise de tres o más puntos de los cuatro síntomas calificados, donde la EAM leve es de 3-5 puntos, La EAM moderado de 6 a 9 puntos y la EAM severa es de 10 a 12 puntos (Roach RC y col 2018).

Los principales síntomas de EAM que padecieron los voluntarios son dificultad respiratoria en apnea del sueño, debilidad, mareos, cefalea, inapetencia, somnolencia e insomnio; sin embargo, el 85% de los voluntarios tiene una puntuación de Lake Louise inferior a 3 y el 15% de los voluntarios tiene una puntuación de 3-5 de Lake Louise, por lo que padecen EAM leve. Los voluntarios presentan una saturación de oxígeno promedio 83 ± 5 % y una frecuencia del pulso de 95 ± 18 veces a 4300 m. s. n. m.

El 55% de los participantes utilizó la técnica durante VVR un mes, y el 45 % de ellos no la aplicó. Por lo tanto, el principal problema de VVR es que los trabajadores de faenas de altura se les olvida aplicar los ejercicios respiratorios asociados a VVR para prevenir la EAM. Para evaluar el VVR para prevenir EAM se les solicitó a los voluntarios que realicen un registro diario de las saturaciones de oxígeno y frecuencias de pulso en faenas a 4200 m. s. n. m; sin embargo solo el 10% de los voluntarios realizó un registro de las saturaciones de oxígeno el cual fue de saturaciones sobre 95% y ninguno de ellos realizó el registro de las saturaciones de pulso. Por lo tanto, si bien, el uso de VVR para prevenir la EAM, es de simple realización, tiene la desventaja que los participantes olvidan realizarlo y no hubo cumplimiento de los participantes para evaluar su efectividad, en faenas sobre 4000 m. s. n. m.

II. Uso de antioxidantes como agentes para prevenir la enfermedad aguda de montaña en trabajadores de altura geográfica

a. Elección del extracto de arándanos

La capacidad antioxidante se evalúa utilizando el procedimiento de prueba de Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno (ORAC). Se ha descrito que el jugo de arándano posee una capacidad antioxidante de 2,906 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$; la cual es una capacidad antioxidante muy superior a otros jugos incluidos los de granada, manzana, ciruela y uva Concord (Wu X y cols 2004).

La elección del jugo de arándanos se basó en obtener un jugo que presente un ORAC cercano a 2,906 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ (capacidad antioxidante); que tenga un perfil de polifenoles, antocianinas elevado; que esté disponible en el comercio en grandes cantidades; que tenga facilidades para almacenar y para transportar a una faena minera de altura y que posea un envase cómodo para su consumo en faena minera de altura.

El jugo disponible en el comercio en grandes cantidades (720 litros necesarios para el estudio), que tiene facilidades de almacenar, transportar y que posee un envase apropiado para su consumo es el jugo fresco de arándanos de empresas Watt's, el cual está en el formato de 1 litro.

El jugo de arándanos Watt's posee gran cantidad de polifenoles y antocianinas, por lo que posee una capacidad antioxidante de $2800,97 \pm 184,63$ $\mu\text{mol TE}/100\text{ml}$, el cual está en el rango de lo descrito

por Wu X y cols, 2004.

Dado que el jugo de arándanos tuvo que ser almacenado por 21 días, periodo de duración del estudio, se procedió a evaluar si las propiedades antioxidantes del jugo de arándano Watt's almacenado se mantienen. Se comprobó que el jugo de arándanos de compañías Watt's almacenado por 34 días no modifica la composición de polifenoles o antocianinas y mantiene la capacidad antioxidante (Tabla 2).

Tabla 2: Caracterización del jugo de arándanos Watt's. Se realizó un análisis de polifenoles totales, concentración de antocianinas y capacidad antioxidante del producto comercial jugo de arándanos Watt's formato de 1 litro, en el día 0 de envasado y en el día 34 después de envasado.

Análisis	Jugo arándano (tiempo 0 día)	Jugo arándano (tiempo 34 días)
Polifenoles totales (100ml)	220,78 ± 16,72 mg EAG/100ml	224,27 ± 14,14 EAG/100ml
Antocianinas totales (100ml)	16,33 ± 1,21 mg EqC3G/100ml	18,08 ± 1,38 mg EqC3G/100ml
Capacidad antioxidante método ORAC Hidro (100 ml)	2800,97 ± 184,63 μmoles TE/100ml	2713,18 ± 271,01 μmoles TE/100ml

b. Características de los voluntarios que participaron en el estudio de uso de antioxidantes del arándano como agentes para prevenir la enfermedad aguda de montaña en trabajadores de altura geográfica. Puntaje de Lake Louise y cambios fisiológicos no asociados a la EAM posterior a la administración del jugo de arándanos en voluntarios que realizan trabajos en faenas sobre los 4300 m. s. n. m. en compañía minera Caserones.

Este estudio se inició con 34 voluntarios de dos turnos diferentes de los cuales 17 corresponden al turno que realizan faenas de día y 17 voluntarios realizan faenas en el turno de noche. El estudio se finalizó con 28 voluntarios, de los cuales 16 voluntarios realizan faenas en el turno de día y 12 voluntarios realizan faenas en el turno de noche. Las muestras de plasma y controles clínicos fueron tomadas en los policlínicos de Minera Caserones a 4300 m.s.n.m para el turno de día; y a 2000 m. s. n. m. para el turno de noche.

Los grupos de voluntarios que terminaron el estudio de los turnos de día y noche están en un rango de edad e IMC similar (Tablas 3-4).

Tabla 3: Características de la población de los voluntarios que participaron en el estudio del uso de antioxidantes como agentes para prevenir la enfermedad aguda de montaña. Los trabajadores realizaron faenas en turno de día sobre los 4200 m. s. n. m, en compañía minera

Caserones en turnos 7x7 (n=13) y en turnos 4x3 (n=3).

Edad promedio	39 ± 8 años
Tiempo promedio en faenas sobre 3000 m. s. n. m.	7,5 ± 3,1 años
% de voluntarios que practican deportes al menos una vez a la semana	36,4 %
% de voluntarios que bebe alcohol	73 %
% de los voluntarios que presenta problemas respiratorio asociados a la EAM	18,2 %
% de los voluntarios que presenta problemas cardiacos.	0%
% de los voluntarios que presenta problemas neurológicos asociados a la EAM	45,5 %
% de los voluntarios que presenta problemas fatiga asociados a la EAM	36,4 %
IMC promedio	29,8 ± 3 Kg/m ²

Tabla 4: Características de la población de los voluntarios que participaron en el estudio del uso de antioxidantes como agentes para prevenir la enfermedad aguda de montaña. Los trabajadores realizaron faenas en turno de noche sobre los 4200 m.s.n.m, en compañía minera Caserones en turnos 7x7 (n=12).

Edad promedio	41 ± 8 años
Tiempo promedio en faenas sobre 3000 m. s. n. m	5,3 años
% de voluntarios que practican deportes al menos una vez a la semana	55,6 %
% de voluntarios que bebe alcohol	78 %
% de los voluntarios que presenta problemas respiratorio asociados a la EAM	11 %
% de los voluntarios que presenta problemas cardiacos.	0%
% de los voluntarios que presenta problemas neurológicos asociados a la EAM	44,4 %
% de los voluntarios que presenta problemas fatiga asociados a la EAM	11,1 %
IMC promedio	30,6 ± 3 Kg/m ²

Los principales síntomas de EAM que padecieron los voluntarios del turno de día son dificultad respiratoria en apnea del sueño, debilidad; mareos; cefalea; inapetencia; somnolencia e insomnio. El 91 % de los voluntarios del turno de día tiene una puntuación de Lake Louise inferior a 3 y el 9% de los voluntarios tiene una puntuación de 3-5 de Lake Louise por lo que padecen EAM leve. Los voluntarios del turno de día presentaron una saturación de oxígeno a 4300 m. s. n. m. de 82,9 ± 5,3 % y una frecuencia del pulso de 95 ± 18.

Por otra parte, el 78 % de los voluntarios del turno de noche tiene una puntuación de Lake Louise inferior a 3 y el 22 % de ellos tiene una puntuación de 3-5 de Lake Louise por lo que padecen EAM leve. Los voluntarios del turno de noche presentaron una saturación de oxígeno a 2000 m. s. n. m. de 95 ± 2 % y una frecuencia del pulso de 80 ± 7 .

Para ambos turnos luego de las tomas de muestras de T0 y T1, se les administró para su consumo 1 litro diario de jugo de arándano por 3 semanas (2 semanas en faena y una semana en casa).

En el día de la última toma de muestra (T2), se procedió a realizar una entrevista, a los voluntarios. Si bien se les dio 1 litro de jugo, los voluntarios consumieron en promedio $0,97 \pm 0,1$ litros diario (85 % de los voluntarios declaró haber consumido 1 litro/diario y el 15 % de los voluntarios declaró haber consumido 0,75 litro/diario).

De igual forma, mediante una entrevista fue evaluada la EAM de acuerdo al puntaje de Lake Louise y otros efectos fisiológicos positivos o negativos, luego de 3 semanas de consumo de jugo de arándano. Ninguno de los voluntarios tiene una puntuación de 3-5 de Lake Louise por lo que no se encontraron voluntarios con EAM leve.

Con respecto a otros efectos fisiológicos no asociados a la EAM, se puede decir que el 14,3% no tuvo ningún efecto asociado al consumo de jugo fresco de arándano; el 85,7% de los voluntarios declaró que aumentó su evacuación intestinal de manera positiva, eliminando el estreñimiento que padecen debido a la alimentación que poseen en faena; el 7,1 % de los voluntarios tuvo un aumento de la frecuencia de micción, pero sin llegar a ser una molestia; el 7,1% de los voluntarios declaró que mejoró su capacidad aeróbica, asociado a la práctica de un tipo de deporte o simplemente para subir escaleras; el 3,6% de los voluntarios declaró que el dolor de pies asociado a la altura desapareció (Tabla 5). Y por último el 100% de los voluntarios declaró que les gustaría seguir consumiendo este producto fresco de jugo de arándano diariamente y de manera habitual, pues en la faena los trabajadores no consumen muchos productos frescos.

Tabla 5: Efectos no asociados a la EAM, del consumo de extracto fresco de arándano. Efectos asociados al consumo de extracto fresco de arándano en los voluntarios que participaron en el estudio del uso de antioxidantes como agentes para prevenir la enfermedad aguda de montaña y que realizan faenas en turno de noche o de día sobre los 4200 m. s. n. m., en compañía minera Caserones (n=28).

Efecto fisiológico asociado al consumo de jugo de arándano	Porcentaje de voluntarios
Aumento del tránsito intestinal	85,7 %
Mejoría en la capacidad aeróbica	7,1 %
Aumento de la frecuencia de micción	7,1 %
Disminución del dolor e hinchazón de pies	3,6 %
Sin ningún efecto	14,3 %

c. Efecto de la administración del jugo de arándanos la saturación de oxígeno en voluntarios que realizan trabajos en faenas sobre los 4300 m. s. n. m. en compañía minera caserones.

Los voluntarios del turno de noche no tuvieron un cambio significativo asociado a la saturación de oxígeno en reposo; y presentan valores de saturación de oxígeno superiores al 95% en las tres tomas de muestra (T0, T1, T2). Esto es debido a que la medición de saturación de oxígeno fue realizada a los 2000 m. s. n. m. durante los 3 tiempos de toma de muestra. Por lo tanto, los voluntarios del turno de noche presentan niveles normales de saturación de oxígeno asociados a esa altitud.

La medición de la saturación de oxígeno a voluntarios del turno de día, fue medida en reposo a 4300 m. s. n. m., donde la saturación de oxígeno de los voluntarios posterior al descanso de 7 días (tiempo 0:T0) y posterior a 7 días de faena (tiempo 1:T1), no presentan diferencias significativas. Las saturaciones de oxígeno promedio de los voluntarios en los tiempo 0 y 1 son inferiores al 84%, lo cual es un indicador de una mala aclimatación de los trabajadores en faenas de 4300 m. s. n. m, tanto cuando se presentan el primer día de trabajo al finalizar su descanso, como también al finalizar el séptimo día en faena. Sin embargo luego de 3 semanas consumiendo jugo de arándanos (tiempo 2:T2) los trabajadores aumentan significativamente la saturación de oxígeno, por lo que hay una recuperación de la función, llegando casi a valores promedios normales cercano al 90% de saturación de oxígeno (Figura 5).

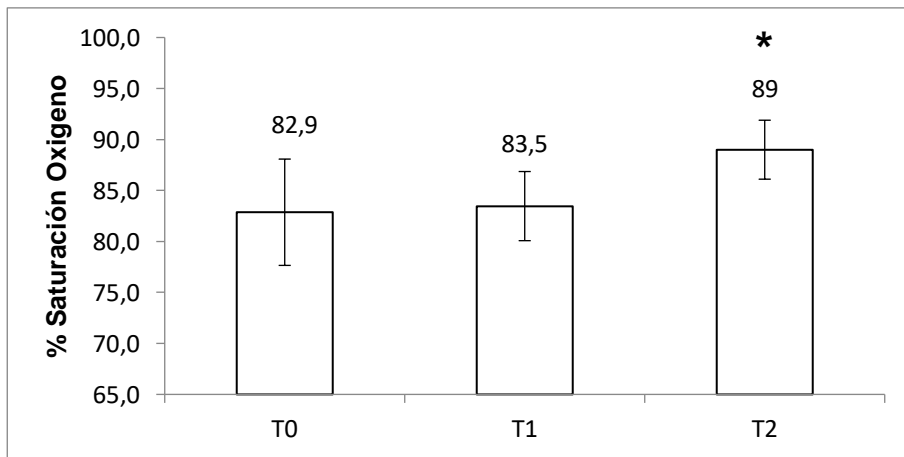


Figura 5: Saturación de oxígeno promedio a 4300 m. s. n. m. de trabajadores del turno de día que se encuentran en faenas de Minera Caserones. T0 = saturación de oxígeno posterior al descanso de 7 días; T1 = saturación de oxígeno después de 7 días en faena a 4300 m. s. n. m; T2 = saturación de oxígeno posterior a la administración de 1 litro diario de jugo de arándano por 3 semanas; n=16; (promedio \pm desv. estándar) (*) muestra una diferencia significativa del T2 comparada con T0 y T1 ($p < 0,01$).

d. Efecto de la administración del jugo de arándanos la frecuencia de pulso en voluntarios que realizan trabajos en faenas sobre los 4300 m. s. n. m. en compañía minera caserones.

Los voluntarios del turno de noche no tuvieron un cambio significativo asociado a frecuencia de pulso en las tres tomas de muestra (T0, T1, T2). Esto es debido a que la medición de frecuencia de pulso fue realizada a los 2000 m. s. n. m. durante los 3 tiempos de toma de muestra. Por lo tanto los voluntarios del turno de noche presentan niveles normales de frecuencia de pulso (Figura 6).

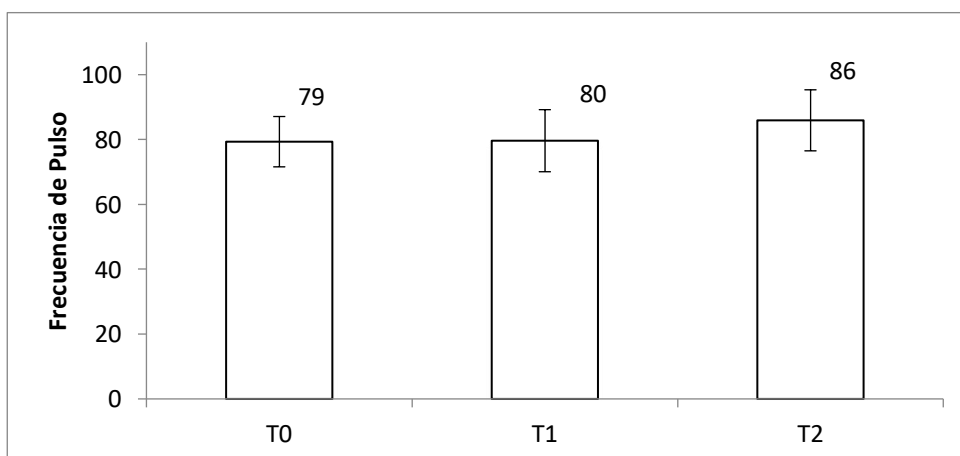


Figura 6: Frecuencia de pulso promedio a 2000 m. s. n. m. de trabajadores del turno de noche que se encuentran en faenas de Minera Caserones. T0 = frecuencia de pulso posterior al

descanso de 7 días; T1 = frecuencia de pulso después de 7 días en faena a 4300 m. s. n. m.; T2 = frecuencia de pulso posterior a la administración de 1 litro diario de jugo de arándano por 3 semanas. n=12; (promedio \pm desv. estándar).

La medición de la frecuencia de pulso a voluntarios del turno de día, fue medida en reposo a 4300 m. s. n. m, donde la frecuencia de pulso de los voluntarios en el primer día de faena, posterior al descanso (T0) es significativamente mayor, si compara con la frecuencia de pulso luego de estar 7 días en faena (T1) y luego de haber consumido durante un mes jugo de arándano (T2). Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los T1 y T2 (Figura 7). De igual manera no existen diferencias significativas en la frecuencia de pulso entre los T1 y T2 del turno de día y los T0, T1 y T2 del turno de noche. Si bien un aumento en la frecuencia de pulso es una respuesta a la hipoxia hipóbarica, también un aumento en la frecuencia de pulso se ha asociado en la clínica a una mayor morbimortalidad cardiovascular. Por lo que una disminución en la frecuencia de pulso normal (sin ser una bradicardia) está asociada a una mejor aclimatación a la hipoxia hipobárica y a una disminución a la morbimortalidad cardiovascular.

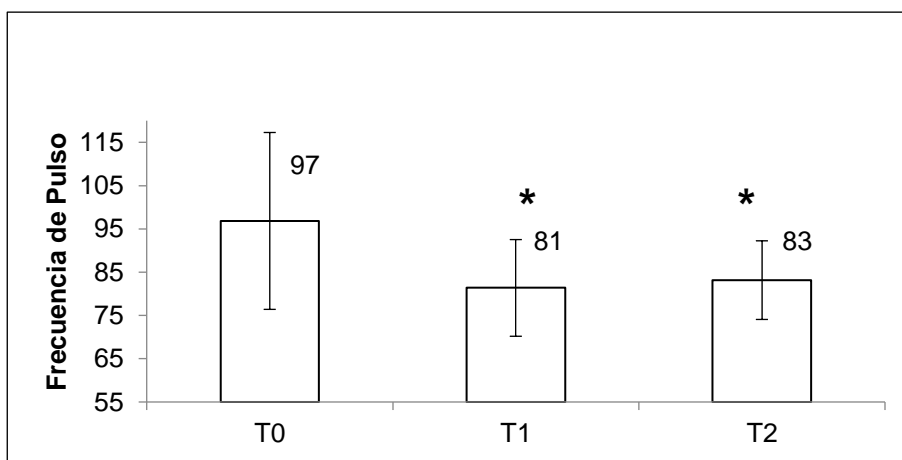


Figura 7: Frecuencia de pulso promedio a 4300 m. s. n. m de trabajadores del turno de día que se encuentran en faenas de Minera Caserones. T0 = frecuencia de pulso posterior al descanso de 7 días; T1 = frecuencia de pulso después de 7 días en faena a 4300 m. s. n. m; T2 = frecuencia de pulso posterior a la administración de 1 litro diario de jugo de arándano por 3 semanas. n=16; (promedio \pm desv. estándar). (*) muestra una diferencia significativa del T2 y T1 comparada con T0 ($p < 0,05$).

e. Efecto de la administración del jugo de arándanos la capacidad antioxidante y daño oxidativo de macroméculas del plasma en voluntarios que realizan trabajos en faenas sobre los 4300 m. s. n. m. en compañía minera caserones.

Se ha descrito que existiría una correlación directa entre la EAM y el daño oxidativo (Irrázaval y col 2017), por lo que se procedió a evaluar en los voluntarios la capacidad antioxidante del plasma, los productos de oxidación avanzado de proteínas (AOPP) y el malondialdehído (MDA) como un marcador de oxidación de los lípidos en los Tiempos 0, 1 y 2 (T0, T1, T2).

e.1. Efecto de la administración del jugo de arándanos, en la capacidad antioxidante del plasma en voluntarios que realizan trabajos en faenas sobre los 4300 m. s. n. m en compañía minera caserones.

Para la cuantificación de la capacidad antioxidante del plasma se utilizó el método descrito en

Urquiaga y cols. 2011, basado en la eliminación del radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH).

En los voluntarios que trabajan en faenas a 4300 msnm en el turno de noche y de día; se aprecia que existe una disminución promedio entre la capacidad antioxidante en el T1 comparada con el T0, sin embargo esta disminución no es estadísticamente significativa. Por otra parte, la administración de jugo de arándano por 3 semanas (T2) aumenta significativamente la capacidad antioxidante del plasma, comparada con T0 y T1 (Figuras 8 y 9). Este resultado demuestra que hay un aumento de la capacidad antioxidante del plasma en voluntarios que consumen jugo de arándano diariamente. Por otra parte, no existe diferencia significativa entre el aumento de la capacidad antioxidante del T3 del turno de día y el turno de noche.

Un aumento en la capacidad antioxidante del plasma disminuiría el riesgo de sufrir EAM, y además también un aumento de la capacidad antioxidante del plasma disminuiría el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

La capacidad antioxidante promedio de mineros del turno de noche de faenas a 4300 m. s. n. m. de minera Caserones en el T1 es de $152,56 \pm 23,01 \mu\text{M}$ Equivalente de Trolox y de $148,86 \pm 27 \mu\text{M}$ Equivalente de Trolox para mineros del turno de día. Esta capacidad antioxidante es mayor a personas que tienen al menos un componente de síndrome metabólico la cual fue tiene un valor de $93,47 \pm 28,11 \mu\text{M}$ Equivalente de Trolox (Urquiaga y cols 2015), pero inferior a lo descrito en la capacidad antioxidante de personas sanas los cuales presentan una capacidad aproximada de $250 \pm 20 \mu\text{M}$ Equivalente de Trolox (Urquiaga y cols 2010). Y si bien el consumo de arándanos aumentó la capacidad antioxidante en promedio en los 28 voluntarios a $165 + 29,9 \mu\text{M}$ Equivalente de Trolox; este aumento aún está por debajo de los valores normales reportados.

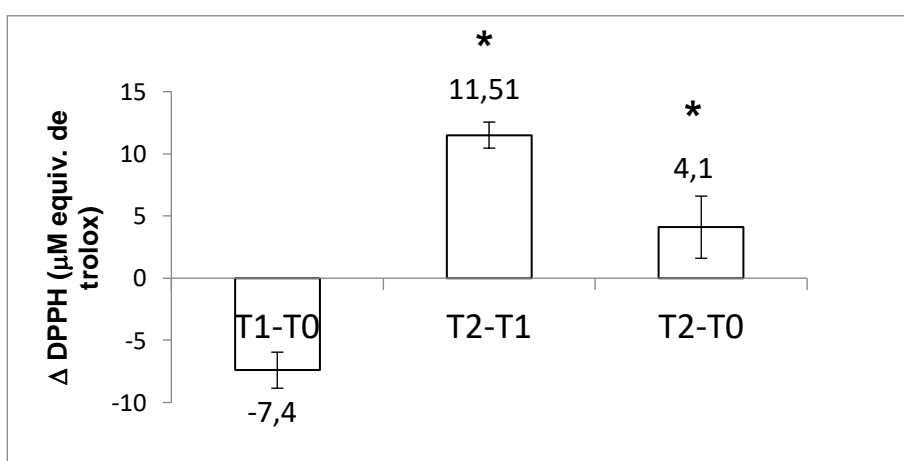


Figura 8: Efecto del consumo de jugo de arándanos (1 litro diario) en la actividad de eliminación del radical de DPPH, en plasma humano de trabajadores que se encuentran en faenas a 4300 m. s. n. m en el turno de día de Minera Caserones. T0 = capacidad antioxidante del plasma (μM equivalentes de Trolox) en el primer día de faena posterior al descanso de 7 días; T1 = capacidad antioxidante del plasma (μM equivalentes de Trolox) después de 7 días en faena a 4300 m. s. n. m.; T2 = capacidad antioxidante del plasma (μM equivalentes de Trolox) posterior a la administración de 1 litro diario de jugo de arándano por 3 semanas; n=16; (promedio \pm desv. estándar). (*) muestra una diferencia significativa del T2-T1

y T2-T0 comparada con T0 -T1 ($p < 0,05$).

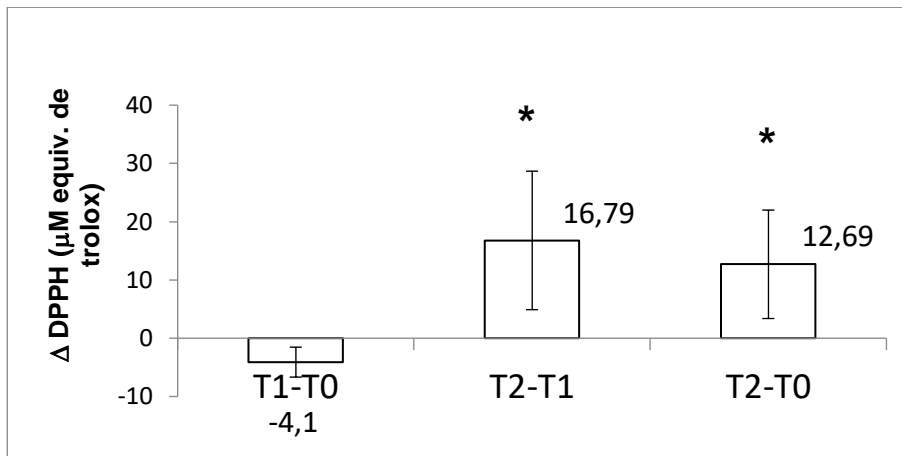


Figura 9: Efecto del consumo de jugo de arándanos (1litro diario) en la actividad de eliminación del radical de DPPH en plasma humano de trabajadores que se encuentran en faenas a 4300 m. s. n. m del turno de noche en Minera Caserones. T0 = capacidad antioxidante del plasma (μM equivalentes de Trolox) posterior al descanso de 7 días; T1 = capacidad antioxidante del plasma (μM equivalentes de Trolox) después de 7 días en faena a 4300 m. s. n. m.; T2 = capacidad antioxidante del plasma (μM equivalentes de Trolox) después de 3 semanas tomando jugo de arándano; $n=12$; (promedio \pm desv. estándar). (*) muestra una diferencia significativa del T2-T1 y T2-T0 comparada con T0 -T1 ($p < 0,05$).

La capacidad antioxidante del plasma está dada principalmente por factores endógenos como lo son por ejemplo las enzimas antioxidantes y moléculas antioxidantes como el glutatión; pero también contribuye a la capacidad antioxidante los factores exógenos como lo son por ejemplo las vitaminas (vitamina E, C) y polifenoles de la dieta entre otros.

La vitamina C es un antioxidante de rápida acción que varía su cantidad dependiendo de la dieta que incluya; como también depende de la concentración de las demás defensas antioxidantes endógenas y exógenas. Por ello que se evaluó la cantidad de vitamina C en los voluntarios, y se encontró que no existirían diferencias significativas entre los tiempos T0 y T1, sin embargo, en el T2 existe un aumento significativo en la concentración de vitamina C, luego de consumir jugo de arándanos por un mes (Figura 10). Este aumento es debido a que el jugo de arándano contiene vitamina C y además contribuye al aumento de las defensas antioxidantes endógenas, por lo que ambos factores contribuyen a un aumento de vitamina C en el plasma. Se debe también notar que la concentración de vitamina C de los voluntarios de faenas mineras en T0 y T1 es muy baja comparada con sujetos no expuestos (Day y cols 1979); y si bien el jugo de arándano aumenta significativamente la concentración de vitamina C, esta concentración de vitamina C aún se encuentra en el límite inferior de los rangos normales.

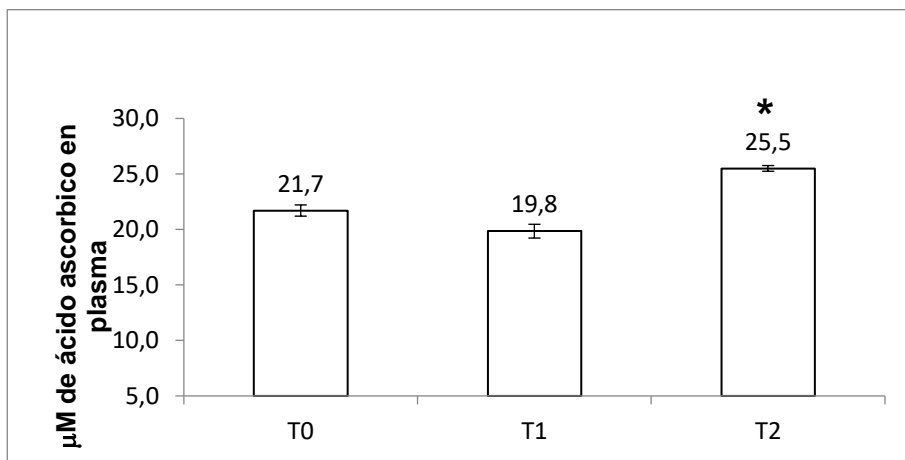


Figura 10: Efecto del consumo de jugo de arándanos (1litro diario) en la concentración de vitamina C en plasma humano de trabajadores que se encuentran en faenas a 4300 m. s. n. m. en Minera Caserones. T0 = Concentración de vitamina C del plasma (μM) posterior al descanso de 7 días; T1 = Concentración de vitamina C del plasma (μM) después de 7 días en faena a 4300 msnm; T2 = Concentración de vitamina C del plasma (μM) después de 3 semanas tomando jugo de arándano; n=28; (promedio \pm error. estándar). (*) muestra una diferencia significativa del T2 comparada con T0 y T1 ($p < 0,05$).

e.2. Efecto de la administración del jugo de arándanos en el daño oxidativo de macromólulas del plasma en voluntarios que realizan trabajos en faenas sobre los 4300 m. s. n. m. en compañía minera caserones.

Para evaluar si el jugo de arándanos tiene un efecto en la oxidación de los lípidos, se cuantificó la concentración de malondialdehído (MDA) como un marcador de oxidación de los lípidos.

En los voluntarios que trabajan en faenas a 4300 m. s. n. m. en el turno de noche; se aprecia que existe una disminución promedio en la concentración de MDA en el plasma en el T1 y el T2 comparada con el T0, sin embargo esta disminución no es estadísticamente significativa (Figura 11).

En los voluntarios que trabajan en faenas a 4300 m. s. n. m. en el turno de día; se aprecia que existe una disminución estadísticamente significativa en la concentración de MDA en el plasma en el T1 y el T2 comparada con el T0 sin embargo, no hay diferencia estadísticamente significativa en la concentración de MDA entre el T2 y el T1 (Figura 12).

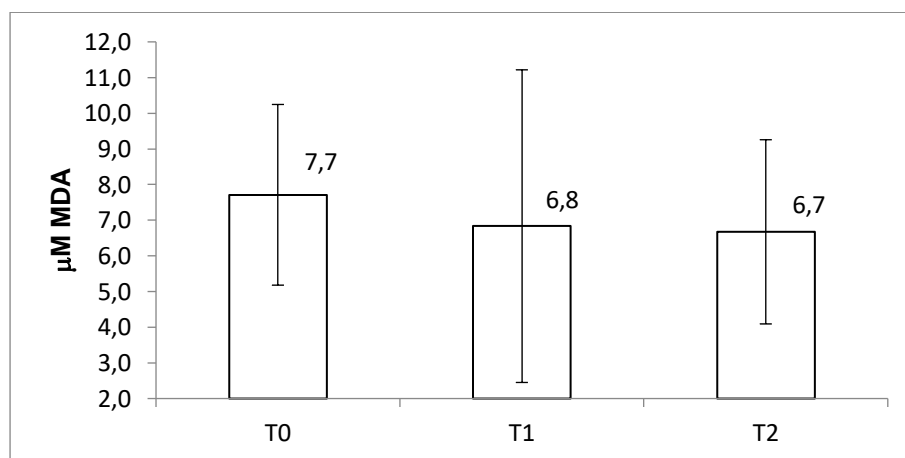


Figura 11: Efecto del consumo de jugo de arándanos (1litro diario) en la concentración de malondialdehído (MDA) en plasma humano de trabajadores que se encuentran en faenas a 4300 m. s. n. m. del turno de noche en Minera Caserones. T0 = concentración MDA en plasma (μM) posterior al descanso de 7 días; T1 = concentración MDA en plasma (μM) después de 7 días en faena a 4300 m. s. n. m.; T2 = concentración MDA en plasma (μM) después de 3 semanas tomando jugo de arándano; n=12; (promedio \pm desv. estándar).

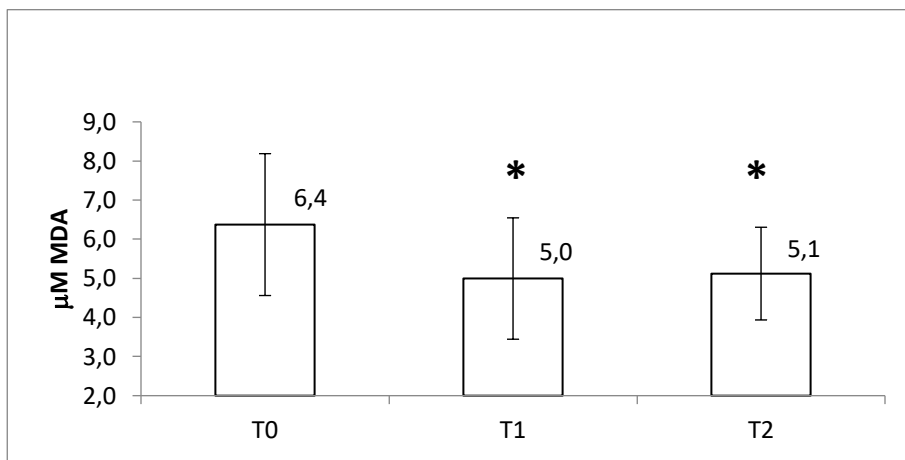


Figura 12: Efecto del consumo de jugo de arándanos (1litro diario) en la concentración de malondialdehído (MDA) en plasma humano de trabajadores que se encuentran en faenas a 4300 m. s. n. m. del turno de día en Minera Caserones. T0 = concentración MDA en plasma (μM) posterior al descanso de 7 días; T1 = concentración MDA en plasma (μM) después de 7 días en faena a 4300 m. s. n. m.; T2 = concentración MDA en plasma (μM) después de 3 semanas tomando jugo de arándano; $n=16$; (promedio \pm desv. estándar). (*) muestra una diferencia significativa de T2 y T1 comparada con T0 ($p < 0,05$).

Para evaluar si el jugo de arándanos tiene un efecto en la oxidación de las proteínas, se cuantificó la concentración de los productos de oxidación avanzada de proteínas (AOPP) (AOPP) como un marcador de oxidación de las proteínas.

En los voluntarios que trabajan en faenas a 4300 m. s. n. m. en el turno de noche; se aprecia que existe una disminución estadísticamente significativa en la concentración de AOPP en el plasma en el T1 y el T2 comparada con el T0 sin embargo, no hay diferencia estadísticamente significativa en la concentración de AOPP entre el T2 y el T1 (Figura 13).

En los voluntarios que trabajan en faenas a 4300 m. s. n. m. en el turno de día; se aprecia que existe una disminución promedio en la concentración de AOPP en el plasma en el T1 y el T2 comparada con el T0, no obstante, esta disminución no es estadísticamente significativa (Figura 14).

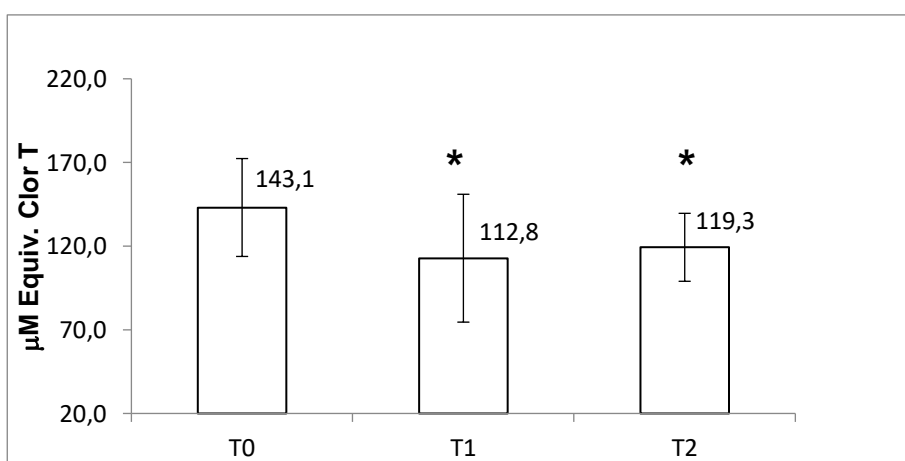


Figura 13: Efecto del consumo de jugo de arándanos (1litro diario) en la concentración de productos de oxidación avanzada de proteínas (AOPP) en plasma humano de trabajadores que se encuentran en faenas a 4300 m. s. n. m del turno de noche en Minera Caserones. T0 = μM equivalentes de Cloramina T en plasma posterior al descanso de 7 días; T1 = μM equivalentes de Cloramina T después de 7 días en faena a 4300 m. s. n. m.; T2 = μM equivalentes de Cloramina T después de 3 semanas tomando jugo de arándano; $n=12$; (promedio \pm desv. estándar). (*) muestra una diferencia significativa de T2 y T1 comparada con T0 ($p < 0,05$).

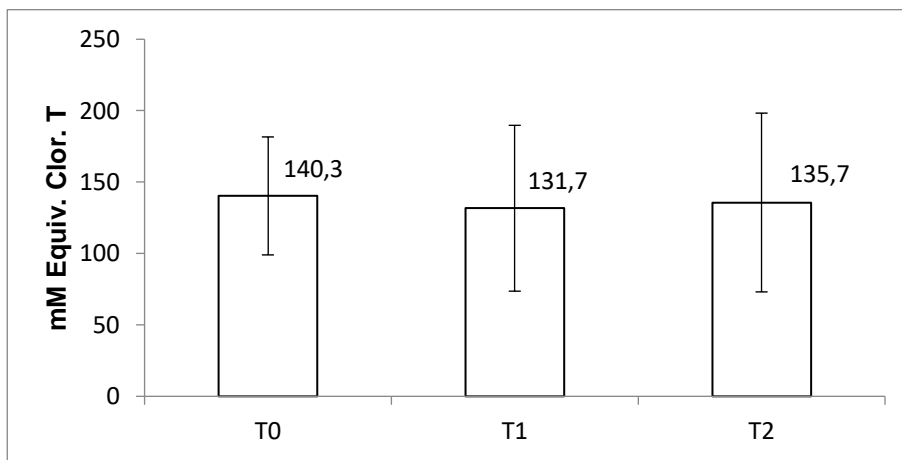


Figura 14: Efecto del consumo de jugo de arándanos (1litro diario) en la concentración de productos de oxidación avanzado de proteínas (AOPP) en plasma humano de trabajadores que se encuentran en faenas a 4300 m. s. n. m. del turno de día en Minera Caserones. T0 = μ M equivalentes de Cloramina T en plasma posterior al descanso de 7 días; T1 = μ M equivalentes de Cloramina T después de 7 días en faena a 4300 m. s. n. m.; T2 = μ M equivalentes de Cloramina T después de 3 semanas tomando jugo de arándano; n=16; (promedio \pm desv. estándar).

El primer día de faena a 4300 m. s. n. m. los voluntarios presentaron una disminución de la capacidad antioxidante del plasma lo que lleva a un aumento en el daño oxidativo de lípidos y proteínas. Y si bien la administración de jugo de arándano por 3 semanas aumenta la capacidad antioxidante, este aumento no es suficiente para contrarrestar el daño oxidativo que sufren las proteínas en turno de día y la oxidación de lípidos en el turno de noche.

f. Efecto de la administración del jugo de arándanos en marcadores de inflamación en voluntarios que realizan trabajos en faenas sobre los 4300 m. s. n. m. en compañía minera caserones.

Diversos estudios han hallado una relación entre la enfermedad montaña y una serie de biomarcadores inflamatorios, es así como se ha encontrado una correlación positiva entre el grupo que presentó AMS y las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , TNF- α y IL-6 (Wang C y cols 2018). Además, se ha hallado una correlación positiva entre la AMS y la interleuquina 10 (IL-10). La IL-10 es una citoquina central que durante la fase de resolución de la inflamación es un supresor general de citoquinas que inhibe las respuestas proinflamatorias de las vías inmunes innatas y adaptativas y previene las lesiones tisulares causadas por respuestas inmunes adaptativas exacerbadas, regulando a la baja la expresión de IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- α (Liu y col 2017; Trifunovic y cols 2015).

Por lo anterior, se estudió el efecto de la administración de jugo de arándanos en la concentración plasmática de los marcadores de inflamación IL-6 y TNF- α y de la citoquina antiinflamatoria IL-10 en los voluntarios que trabajan en faenas a 4300 m. s. n. m.

Con respecto a la concentración de IL-10 e IL6, no hubo cambio significativo en la concentración plasmática de los voluntarios en los T0, T1 y T2. Sin embargo, en los voluntarios que trabajan en faenas a 4300 m. s. n. m. en los turnos de día y de noche se aprecia que existe una disminución estadísticamente significativa en la concentración de TNF- α , en el plasma en el T2 comparada con los T0 y T1 sin embargo, no hay diferencia estadísticamente significativa en la concentración de TNF- α entre el T0 y el T1 (Tabla 6).

Por consiguiente, el consumo de jugo de arándano no tiene efecto alguno en los niveles de IL-6 e IL-

10 en los voluntarios del turno de día y en el turno de noche. No obstante, disminuye el TNF- α plásmatico, por lo que disminuiría la señalización celular a través de TNFR1, que produce principalmente la activación de los factores de transcripción NF- κ B y AP-1, y la expresión de genes que codifican citoquinas, quimiocinas, moléculas antiapoptóticas y de supervivencia celular (Béguin y cols 2019).

Tabla 6: Concentración de IL-6, IL-10 y TNF- α en el plasma de voluntarios que trabajan en faenas a 4300 m. s. n. m. en compañía minera caserones. Efecto del consumo de jugo de arándanos (1litro diario) en la concentración de IL-6, IL-10 y TNF- α en plasma humano de trabajadores que se encuentran en faenas a 4300 m. s. n. m. de los turnos de noche y de día de Minera Caserones. *T0 = Concentración de IL-6, IL-10 y TNF- α en el plasma posterior al descanso de 7 días; T1 = Concentración de IL-6, IL-10 y TNF- α en el plasma después de 7 días en faena a 4300 m. s. n. m.; T2 = Concentración de IL-6, IL-10 y TNF- α en el plasma después de 3 semanas tomando jugo de arándano;* n=28; (promedio \pm desv. estándar). (**) muestra una diferencia significativa de T2 comparada con T1 y T0 ($p < 0,05$)

		Turno día	Turno Noche
IL-6(pg/mL)	T0	0,18 \pm 0,43	1,54 \pm 3
	T1	0,67 \pm 0,98	2,48 \pm 3
	T2	0,49 \pm 1,29	3,78 \pm 5,5
IL-10 (pg/mL)	T0	2,2 \pm 3,3	3,5 \pm 4,2
	T1	4,7 \pm 11,7	4,3 \pm 5,6

	T2	2,8±5,2	4,1±5
TNF-α (pg/mL)	T0	7±4,1	5,4±4,9
	T1	5,3±5	5,9±6,6
	T2	3,7±3,1 **	1,9±2,5 **

VI. Recomendaciones para Sistema de Seguridad y Salud en el Trabajo

- El puntaje de Lake Louis no es un buen método para evaluar la EAM en faenas mineras sobre 4300 m. s. n. m., pues existe un conflicto de interés para el trabajador en responder, pues busca que su puntaje sea bajo. Esto porque un trabajador que presenta, EAM moderado o severo no se considera apto para desempeñar faenas sobre 3000 m. s. n. m. Por esta razón se deberían buscar, otras metodologías para evaluar la EAM, como lo son la saturación de oxígeno y la frecuencia de pulso.
- El efecto de la Respuesta ventilatoria voluntaria (VVR) para prevenir la enfermedad aguda de montaña (EAM); es una técnica fácil de implementar. Eso sí se debe considerar que se debe reforzar constante y repetitivamente la necesidad que se cumpla con los protocolos establecidos en el estudio, pues los trabajadores voluntarios en faena minera sobre 4300 m. s. n. m., lo cumplieron en una baja proporción. En este estudio el 55% de los voluntarios utilizo la técnica VVR durante un mes, para prevenir la EAM. Por lo que se recomienda implementar las enseñanzas del uso de VVR para prevenir la EAM, Se recomienda implementar las enseñanzas del uso de VVR para prevenir la EAM, pues es de fácil implementación y de bajo costo y podría ser útil en los trabajadores que la quieran aplicar.
- El consumo de tres semanas de jugo de arándanos en voluntarios de faenas mineras, tuvo efectos positivos contra la EAM, como lo son el aumento de la saturación de oxígeno a 4300 m. s. n. m.; el aumento de la capacidad antioxidante del plasma; disminución de la oxidación de biomoléculas como lo son lípidos y proteínas; y la disminución de la concentración de TNF α , que es un marcador de inflamación asociado a la EAM. Por lo que se recomienda implementar el uso de extracto de arándanos diariamente en trabajadores que realicen faenas sobre los 3000 m. s. n. m.; para contrarrestar de manera acumulativa los efectos negativos de la EAM, que comprende el aumento del estrés oxidativo e inflamación. Además, el consumo habitual del jugo de arándano tiene un efectos positivos que van más allá de la EAM como lo son el aumento del tránsito intestinal (sin ser una molestia), lo cual ayuda en faenas donde la comida fresca no es consumida habitualmente por

los trabajadores.

VII. Conclusiones

El Efecto de la Respuesta ventilatoria voluntaria (VVR) para prevenir la enfermedad aguda de montaña (EAM) en mineros es limitado, porque estos la realizaron en una baja proporción. Si bien es una técnica fácil de implementar, fue difícil de evaluar su efectividad en faenas mineras diariamente. El 55 % de los voluntarios que aplicaron VVR, una vez finalizado el estudio, aún continúan aplicándola para prevenir la EAM, pues es una técnica de bajo costo y de fácil implementación.

La EAM se produce por la disminución de la presión parcial del oxígeno y el uso del jugo de arándano tiene un efecto positivo en aumentar la saturación de oxígeno en los voluntarios. Este aumento de la saturación de oxígeno se podría explicar, debido a que existirían ciertos polifenoles presentes en el arándano, que activan factores de transcripción asociados a la síntesis de mioglobina, el cual serviría como un reservorio de oxígeno (Yuan D y cols. 2021 ; Stephanau A. 2004).

Existe además una relación directa entre EAM y el daño oxidativo (Irrarrazabal S y cols 2017). El jugo de arándanos posee una gran capacidad antioxidante, por lo que el consumo diario de ese jugo incrementa la capacidad antioxidante del plasma. Los trabajadores que realizan faenas mineras a 4300 m. s. n. m. en minera caserones, presentan una capacidad antioxidante menor a lo que presenta una persona no expuesta y el consumo habitual de jugo de arándanos recuperó parte de la esa capacidad debido a las moléculas antioxidantes que posee el arándano y a las moléculas que regulan los factores de transcripción asociados a la síntesis de moléculas antioxidantes; es decir, el jugo de arándano aumenta los antioxidantes endógenos y exógenos (Cásedas y cols 2017; Tang y cols 2018). Si bien el daño oxidativo de las macromoléculas no fue completamente prevenido, esto puede ser debido a que existió una recuperación parcial de la capacidad antioxidante, por lo que un consumo más prolongado de jugo de arándano prevendría el daño oxidativo una vez recuperada la capacidad antioxidante.

Para finalizar, el consumo de jugo de arándano disminuye la concentración de TNF- α ; y dado que existe una correlación positiva entre la EAM y la citoquina proinflamatoria TNF- α (Wang y cols 2018) el jugo de arándano disminuiría la inflamación asociada a la EAM dependiente de TNF- α .

VIII. Referencias

1. Baillie JK, Thompson AA, Irving JB, Bates MG, Sutherland AI, Macnee W, Maxwell SR, Webb DJ. Oral antioxidant supplementation does not prevent acute mountain sickness: double blind, randomized placebo-controlled trial. *QJM*. 2009 May;102(5):341-8. doi: 10.1093/qjmed/hcp026. Epub 2009 Mar 9. PMID: 19273551.
2. Béguin, E. P., van den Eshof, B. L., Hoogendijk, A. J., Nota, B., Mertens, K., Meijer, A. B., & van den Biggelaar, M. (2019). Integrated proteomic analysis of tumor necrosis factor α and interleukin 1 β -induced endothelial inflammation. *Journal of Proteomics*, 192, 89–101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.08.011>
3. Bharat D, Cavalcanti RRM, Petersen C, Begaye N, Cutler BR, Costa MMA, Ramos RKL, Ferreira MR1, Li Y, Bharath LP, Toolson E, Sebahar P, Looper RE, Jalili T, Rajasekaran NS, Jia Z, Symons JD, Pon Velayutham AB. Blueberry Metabolites Attenuate Lipotoxicity-Induced Endothelial Dysfunction. *Mol Nutr Food Res*. Oct 2017.
4. Cásedas G, Les F, Gómez-Serranillos MP, Smith C, López V. Anthocyanin profile, antioxidant activity and enzyme inhibiting properties of blueberry and cranberry juices: a comparative study. *FOOD FUNCT* 2017.
5. Day B.R., Williams D. R. y Marsh C. A. A rapid manual method for routine assay of ascorbic acid in serum and plasma. *Clinical Biochemistry* 1979, 12; 22-26.
6. Drago S, Campodónico J, Berendsen R, Sandoval M, Hepp J, Vela J, Martí M, Iñiguez G, Buijze G. Voluntary Ventilatory Response is as effective as acetazolamide in preventing Acute Mountain Sickness during two days ascents (NCT02972411). 34th Annual Summer Meeting of the Wilderness Medical Society 2017.
7. Irarrazabal S., Allard C., Campodónico J., Perez D., Strobel P., Vásquez L., Urquiaga I., Echeverría G., Leighton F. Oxidative Stress in Acute hypobaric hypoxia. *HIGH ALTITUDE MEDICINE & BIOLOGY*. 18(2):128-134. 06/2017.
8. Julian CG, Subudhi AW, Hill RC, Wilson MJ, Dimmen AC, Hansen KC, Roach RC. Exploratory proteomic analysis of hypobaric hypoxia and acute mountain sickness in humans. *J Appl Physiol* (1985). 2014 Apr 1;116(7):937-44. doi: 10.1152/jappphysiol.00362.2013. Epub 2013 Nov 21. PMID: 24265281; PMCID: PMC3972748.

9. Lee J; Durst R; Wrolstad R. AOAC Official Method 2005.02 Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines. pH Differential Method. First Action 2005.^[1]_{SEP}
10. Lipman G, Kanaan N, Holck P, Constance B, Gertsch J. Ibuprofen Prevents Altitude Illness: A Randomized Controlled Trial for Prevention of Altitude Illness With Nonsteroidal Anti-inflammatories. *Ann Emerg Med* 2012;59:484-490.
11. Liu, B., Chen, J., Zhang, L., Gao, Y., Cui, J., Zhang, E., ... Gao, Y. (2017). IL-10 Dysregulation in Acute Mountain Sickness Revealed by Transcriptome Analysis. *Frontiers in Immunology*, 8, 628. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00628>
12. Minería Chilena, 5 de agosto 2016. <http://www.mch.cl/reportajes/efectos-la-altura-trabajadores-mineros-senales-fortalecer-la-prevencion/>
13. Moraga F, Florez A, Serra J, Esnaola C, Barriento C. Ginkgo biloba Decreases Acute Mountain Sickness in People Ascending to High Altitude at Ollague (3696 m) in Northern Chile. *Wild Env Med* 2007;18:251-257.
14. O'Connor T, Dubowitz G, Bickler PE. Pulse oximetry in the diagnosis of acute mountain sickness. *High Alt Med Biol.* 2004 Fall;5(3):341-8. doi: 10.1089/ham.2004.5.341. PMID: 15454000.
15. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem.* 2001 Oct;49(10):4619-26. doi: 10.1021/jf010586o. PMID: 11599998.
16. Sikri G, Bhattachar S. Acute mountain sickness and duration of pre-exposure to high altitude. *Neuroreport.* 2016 Sep 7;27(13):997. doi: 10.1097/WNR.0000000000000640. PMID: 27483198.
17. Stephanou A. (2004). Role of STAT-1 and STAT-3 in ischaemia/reperfusion injury. *Journal of cellular and molecular medicine*, 8(4), 519–525. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2004.tb00476.x>
18. Ramos Marcia. Trabajo de Alturas geográfica en Chile. Instituto de Salud Pública. Ministerio de Salud. Junio 2015.
19. Resumen Ejecutivo. Estudio sobre los efectos de la salud asociados a la exposición intermitente crónica a altura geográfica en mineros de Chile. Noviembre, 2013.
20. Roach RC, Greene ER, Schoene RB, Hackett PH. Arterial oxygen saturation for prediction of acute mountain sickness. *Aviat Space Environ Med.* 1998 Dec;69(12):1182-5. PMID: 9856544.
21. Roach, R. C., Hackett, P. H., Oelz, O., Bärtsch, P., Luks, A. M., MacInnis, M. J., Baillie, J. K., & Lake Louise AMS Score Consensus Committee (2018). The 2018 Lake Louise Acute Mountain Sickness Score. *High altitude medicine & biology*, 19(1), 4–6. <https://doi.org/10.1089/ham.2017.0164>.
22. Singleton, V. L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventos, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology* 1999, 299, 152-178.^[1]_{SEP}
23. Suduchi Subudhi AW, Jacobs KA, Hagobian TA, Fattor JA, Fulco CS, Muza SR, Rock PB, Hoffman AR, Cymerman A, Friedlander AL. Antioxidant supplementation does not

attenuate oxidative stress at high altitude. *Aviat Space Environ Med.* 2004 Oct;75(10):881-8. PMID: 15497369.

24. Tang JS, Vissers MCM, Anderson RF, Sreebhavan S, Bozonet SM, Scheepens A, Melton LD. Bioavailable Blueberry-Derived Phenolic Acids at Physiological Concentrations Enhance Nrf2-Regulated Antioxidant Responses in Human Vascular Endothelial Cells. *Mol Nutr Food Res.* 2018 Mar;62(5). doi: 10.1002/mnfr.201700647. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29278300.
25. Trifunović, J., Miller, L., Debeljak, Ž., & Horvat, V. (2015). Pathologic patterns of interleukin 10 expression--a review. *Biochemia Medica*, 25(1), 36–48. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.004>.
26. Urquiaga I, Strobel P, Pérez D, Martínez C, Cuevas A, Castillo O, Marshall G, Rozowski J, Leighton F. Mediterranean diet and red wine protect against damage in young volunteers. *ATHEROSCLEROSIS.* 211. Pag 696-299 (2010).
27. Urquiaga, I., D'Acuña, S., Pérez, D. *et al.* Wine grape pomace flour improves blood pressure, fasting glucose and protein damage in humans: a randomized controlled trial. *Biol Res* 48, 49 (2015). <https://doi.org/10.1186/s40659-015-0040-9>.
28. Vargas M, Osorio J, Jiménez D, Moraga F, Sepúlveda M, Del Solar J, Hudson C, Cortés G, León A. Acute mountain sickness at sickness at 3500 and 4250 m. A study of symptom incidence and severity. *Rev. Med. Chile.* 2001. 129 (2) pag 166-172.
29. Voet D, Voet J, Pratt C. (2016) *Fundamentals of Biochemistry.* Editorial Wiley.
30. Wang, C., Jiang, H., Duan, J., Chen, J., Wang, Q., Liu, X., & Wang, C. (2018). Exploration of Acute Phase Proteins and Inflammatory Cytokines in Early Stage Diagnosis of Acute Mountain Sickness. *High Altitude Medicine & Biology*, 19(2), 170–177. <https://doi.org/10.1089/ham.2017.0126>.
31. Waterhouse, A.L., Determination of Total Phenolics, in *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, I1.1.1-I1.1.8, Wrolstad, R.E., Wiley, 2001. L¹_{SEP}
32. Wu X, Beecher GR, Holden JM, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Prior RL. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. *J Agric Food Chem.* 2004 Jun 16;52 (12):4026-37. doi: 10.1021/jf049696w. PMID: 15186133.
33. Yuan, D., Yu, H., Liu, S., Hao, L., & Zhang, J. (2021). Prediction and Experimental Verification of a Hierarchical Transcription Factor Regulatory Network of Porcine Myoglobin (Mb). *Animals: an open access journal from MDPI*, 11(12), 3599. <https://doi.org/10.3390/>