



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias
Departamento de Ciencias Biológicas Animales



Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario

***“EFECTO DEL TRATAMIENTO ANTIOXIDANTE (VITAMINAS C+E) EN OVEJAS
GESTANTES EN ALTURA SOBRE LA ACTIVIDAD Y PRESENCIA DE ISOFORMAS DE
ÓXIDO NÍTRICO SINTASA EN TEJIDO PLACENTARIO”***

GISELLA MARISOL PÉREZ SAAVEDRA

PROFESOR GUÍA:
MARCO GALLEGUILLOS CAAMAÑO

Santiago, Chile
2011

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS	i
ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICOS	iii
RESUMEN	iv
SUMMARY	v
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECIFICOS	11
MATERIAL Y MÉTODO	12
RESULTADOS	19
Efecto del tratamiento antioxidante sobre gases sanguíneos en Arteria Uterina (AUT) de ovejas con 100 días de gestación bajo hipoxia hipobárica	19
Efecto del tratamiento antioxidante sobre la presencia de las concentraciones sanguíneas de vitamina C y E en ovejas con 100 días de gestación, bajo hipoxia hipobárica	20
Estandarización de las condiciones óptimas de detección de las isoformas de NOS mediante “western blot”	21
Efecto del tratamiento antioxidante sobre la presencia de isoformas de oxido nítrico sintasa en placenta ovina a los 100 días de gestación bajo hipoxia hipobárica.	23

Efecto del tratamiento antioxidante sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa en placenta ovina a los 100 días de gestación bajo hipoxia hipobárica	25
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICOS

TABLA 1 Gases sanguíneos medidos en Arteria Uterina (AUT)	20
FIGURA1: Análisis western blot para la isoenzima eNOS	24
FIGURA 2: Análisis western blot para la isoenzima eNOS, porción materna y fetal.	23
FIGURA 3: Análisis western blot para la isoenzima nNOS	25
Gráfico 1: Vitamina C en plasma sanguíneo	20
Gráfico 2: Vitamina E en plasma sanguíneo:	20
Gráfico 3: Peso fetal	21
Gráfico 4: Densitometría eNOS en placenta materna	23
Gráfico 5: Densitometría eNOS en placenta fetal	24
Gráfico 6: Actividad NOS en placenta materna	26
Gráfico 7: Actividad NOS en placenta fetal	26
Gráfico 8: Actividad NOS en placenta de oveja	27

RESUMEN

Este estudio evaluó el efecto de la terapia antioxidante sobre la expresión de la isoenzima NOS en placenta de ovejas que gestaron en la altura, debido a que la hipoxia propia de este ambiente genera estrés oxidativo. Para ello se utilizaron dos grupos de ovejas, uno nativo de altura (HH), el otro proveniente del valle Lluta (500 msnm) (LH) que desarrollaron su gestación a una altitud de 3580 m. La mitad de cada grupo recibió diariamente suplementación oral de vitamina C (500 mg) y E (350 UI) durante la preñez. A los 100 días de gestación se midió la concentración plasmática de vitaminas antioxidantes y se determinó la presencia y actividad de isoenzimas NOS (nNOS, iNOS y eNOS), en 4 placentomas por cada animal. La concentración plasmática de vitaminas en ovejas suplementadas fueron dos a tres veces mayor que en ovejas no suplementadas. No se evidenció presencia de las enzimas iNOS y nNOS a través de la técnica de *Western-Blot*. La eNOS fue detectada en las muestras analizadas, siendo mayor la expresión en animales recién expuestos a la hipoxia (LH) que en nativos de esta condición (HH). La administración de vitaminas disminuyó significativamente la expresión de la enzima eNOS en el lado materno de la placenta. En cuanto a la actividad de esta enzima, fue detectada sólo para las isoformas dependientes de Ca^{+2} , detectándose mayor actividad en la placenta fetal de animales suplementados con antioxidantes. Sin embargo, aún cuando la disparidad en el comportamiento de las porciones materna y fetal de la placenta podría estar relacionado a la presencia de diferentes rutas metabólicas, estas se traducen en una aparente mejora en la capacidad de transporte, ya que los fetos de los grupos suplementados logran un mejor crecimiento.

SUMMARY

This study evaluated the effect of antioxidant therapy on the placental expression of NOS isoenzyme in sheep pregnancies at high altitude, due to hypoxia is inherent to this environment which generates oxidative stress. Two groups of sheep were used: one native to highlands (HH) (>3.500 m) and other a native from the Lluta valley (LH) (500 m), taken to high altitude (3.580 m) to develop their pregnancy. One half of each group received a daily oral supplementation of vitamin C (500 mg) and E (350 IU) during pregnancy. After 100 days of gestation, plasma concentrations of antioxidant vitamins and placental expression and activity of NOS isoenzymes (nNOS, iNOS and eNOS) were measured. Plasma vitamin concentration in supplemented ewes were two/three fold than in non-supplemented ewes. The presence of the enzymes iNOS and nNOS, through the western-blot technique, was not evident. eNOS was detected in the samples analyzed, showing higher expression in animals recently exposed to hypoxia (LH) than natives to this condition (HH). The administration of vitamins significantly decreased eNOS expression in the maternal side of the placenta. Only in Ca^{+2} dependent NOS isoforms the activity of this enzyme was detected, which was higher in the fetal placenta of animals supplemented with antioxidants. However, although the differences in the observed patterns between maternal and fetal portions of the placenta could be related to the presence of different metabolic pathways, these results in an apparent improvement in transport capacity, since the fetuses from supplemented groups achieved better growth.

INTRODUCCIÓN

El altiplano chileno es una meseta que se ubica a una altitud media de aproximadamente 4000 m.s.n.m. Las características climáticas y del suelo del sector definen a este ecosistema como frágil. Así, un animal no adaptado a estas condiciones puede sufrir un desequilibrio fisiológico difícil de superar, lo que determina la existencia de una fauna especialmente adaptada a la altura.

El ganado ovino fue introducido a la región alto andina por los españoles hace cientos de años, y constituye junto con los camélidos domésticos propios de la región (llama y alpaca) una de las fuentes de ingreso para los habitantes altiplánicos. Estos animales, si bien se han adaptado a las rigurosas condiciones ambientales del lugar, no expresan sus máximos índices reproductivos y productivos, afectando directamente al producto final y con ello a los ingresos obtenidos.

El hecho de enfrentar una gestación en un ambiente de hipoxia hipobárica, es decir, con baja presión atmosférica y de oxígeno inspirado, pone a prueba la capacidad adaptativa para el desarrollo adecuado de la gestación. Los mecanismos por los cuales la disminución de oxígeno disponible genera los efectos negativos sobre la gestación son variados y no del todo conocidos. Sin embargo, el aumento de las especies reactivas del oxígeno, que en exceso generan estrés oxidativo, podrían afectar la homeostasis metabólica, la expresión de genes y ser en parte los causantes de las diferentes adaptaciones y respuestas encontradas a nivel placentario.

Considerando lo anterior, existen algunos estudios que avalan el uso de antioxidantes como un mecanismo capaz de contrarrestar tales efectos, sumando a esto la importancia que tiene la adaptación a través de largas generaciones a la vida en altura.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

El medio ambiente de altura se caracteriza por baja presión barométrica, frío, aridez y una gran radiación solar. La fauna de los Andes se considera como escasa, sobre todo cuando se la compara con la de las grandes cuencas que se extienden a sus pies. Tal pobreza faunística se debe a las dificultades que plantea la vida en las grandes alturas. A la escasez de alimento se le suman grandes variaciones térmicas diarias, con temperaturas nocturnas que descienden hasta los 20°C bajo cero. Además, a medida que se asciende, el aire se hace mucho más seco y las radiaciones solares más intensas. A esto se le debe agregar que en las capas más altas de la atmósfera hay una menor cantidad de oxígeno, por lo que un animal no adaptado a estas condiciones se encuentra frente a un desequilibrio fisiológico difícil de enfrentar (Cattan, 1993). En general las especies adaptadas a la vida en las grandes alturas disponen de mecanismos homeostáticos que permiten su vida en este ambiente en extremo desfavorable.

Estudios peruanos realizados en reproducción humana en altura, indican que la fertilidad es reducida durante exposición aguda a altas alturas, pero es normal en poblaciones que han nacido y vivido en estas condiciones (Gonzales, 2007). A su vez, el peso al nacimiento declina cuando la madre reside a altas alturas durante la gestación. Sin embargo, la magnitud de este efecto depende del grado de adaptación a las altas alturas (Reynolds *et al.*, 2005).

Por otro lado, las tasas de mortalidad perinatal y neonatal son menores en aquellas poblaciones que han residido en altura durante varias generaciones, en comparación con aquellas que han tenido una corta residencia en altura. Claramente la antigüedad y la genética son importantes componentes en determinar la sobrevivencia y la calidad de vida en altas alturas (Gonzales, 2007). En relación a esto, estudios realizados en poblaciones de mujeres tibetanas demostraron que éstas presentan uno o dos alelos para una mayor saturación de oxígeno, con lo que se aprecia mayor saturación de hemoglobina, teniendo así mayor contenido de oxígeno arterial; por lo tanto ellas tendrían menor estrés fisiológico y así mayor sobrevivencia neonatal. Estos hallazgos sugieren que la hipoxia de

altas alturas, actúa como agente de selección sobre el *locus* para la saturación de oxígeno de la hemoglobina, y así sobre la mayor sobrevivencia neonatal en aquellas mujeres que presentan genotipos para esa característica (Beall *et al.*, 2004).

La gestación en altura de humanos se asocia con cambios compensatorios en la arquitectura microvascular de la placenta fetal, incluyendo incrementos en la bifurcación capilar, lo que se asocia a su vez con aumentos en la densidad de área y superficie capilar ocupada (Reynolds *et al.*, 2005).

En ovejas gestantes en altura, se han demostrado adaptaciones placentarias macroscópicas y microscópicas. Estas respuestas incluyen un incremento en el peso de la placenta, aumento en la vascularización placentaria, además hay una ligera reducción en el número de placentomas. Se ha determinado que cuando la gestación se presenta en ovejas con larga residencia en altura, se incrementa el diámetro del cotiledón, la superficie de contacto cotiledón-carúncula, y el área ocupada por la vasculatura del cotiledón, pero disminuye el número total de cotiledones (Parraguez *et al.*, 2006). Todas estas modificaciones de la placenta anteriormente señaladas, pueden mejorar el intercambio materno fetal, atenuando en parte los efectos de la baja tensión de oxígeno en altura (Parraguez *et al.*, 2006).

Así, estudios realizados tanto en humanos como en animales, son relativamente consistentes, señalando que altas alturas asociado a hipoxia genera daño oxidativo en lípidos, proteínas y DNA. Este daño puede ser relacionado con un incremento en el nivel de producción de especies reactivas al oxígeno (EROS) y/o disminuida capacidad antioxidante. El cambio oxidativo observado en el organismo parece ser directamente proporcional a la mayor altitud. Sin embargo, una aclimatación a largo plazo y/o adaptación genética atenúan o eliminan el estrés oxidativo generado por altas altitudes (Dosek *et al.*, 2007; Parraguez *et al.*, 2011).

La placenta es el órgano a través del cual gases respiratorios, nutrientes y desechos son intercambiados entre la madre y el feto. El desarrollo vascular de la placenta juega un rol

central en el aseguramiento de un adecuado intercambio transplacentario, y de esta manera determinando, finalmente, el peso del feto al nacimiento (Reynolds *et al.*, 2005).

La oveja posee una placenta epiteliochorial, cuyo crecimiento es máximo entre los 20 y 60 días de gestación (Reynolds y Redmer, 1995). Con 60 a 100 placentomas separados, cada uno de los cuales consiste en una porción materna caruncular y fetal cotiledonaria que están interdigitadas, es decir, íntimamente fusionadas. Los placentomas se clasifican en cuatro tipos según diferencias morfológicas (A, B, C y D), predominando el tipo A por sobre los otros. Esta distribución experimenta cambios al existir exposición a la hipoxia, aumentando en estos casos los demás tipos de la placenta en desmedro del tipo A (Penninga y Longo, 1998; Reynolds *et al.*, 2005).

Durante el tercer trimestre de una gestación normal en ovinos, existe un aumento de la demanda metabólica por parte del feto en crecimiento. Junto con ello, aparece un incremento del intercambio fetoplacentar y flujo sanguíneo uteroplacentario (Sheppard *et al.*, 2001). Este incremento, especialmente durante este periodo de gestación, resulta de una vasodilatación y neo vascularización (angiogénesis) a medida que la placenta continúa remodelándose (Sheppard *et al.*, 2001). En ausencia de inervación autonómica de los vasos sanguíneos feto placentarios, la relajación fetoplacentaria ocurre por la influencia de vasodilatadores producidos a nivel local y circulatorio (Sheppard *et al.*, 2001).

Uno de los más potentes, pero a su vez lábil vasodilatador producido por el endotelio de la arteria umbilical es el óxido nítrico (NO) (Sheppard *et al.*, 2001). Además, se le ha atribuido al NO un papel regulador en la angiogénesis (Kwon *et al.*, 2004). La síntesis de NO es catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a partir de oxígeno y L-arginina como sustrato, utilizando tetrahidrobiopterina (BH₄) y nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) como cofactores esenciales, además de FMN, FAD y Ca⁺²-calmodulina (Alderton *et al.*, 2003). El NO generado en el endotelio vascular difunde hacia el músculo liso subyacente donde activa a una guanilato ciclasa soluble, produciendo

GMPc como segundo mensajero, el cual gatilla la reducción del tono vasomotor (Sheppard *et al.*, 2001).

En condiciones normales el organismo origina sustancias altamente oxidantes como los radicales libres y las EROS. La toxicidad de estos compuestos se basa principalmente en la oxidación de lípidos, carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos, afectando su función biológica. Como consecuencia se genera daño oxidativo, el cual puede derivar en diferentes efectos patológicos (Huerta *et al.*, 2005; Askew, 2002; Chappell *et al.*, 2002).

La gestación por si misma es un estado de estrés oxidativo, debido a la alta actividad metabólica de la placenta y materno durante la gestación. Sin embargo, esto se ve aumentado en gestaciones complicadas (preeclampsia, restricción del crecimiento fetal intrauterino, diabetes, etc.), demostrando un aumento en la producción de EROS y una disminución en la defensas antioxidantes (Giuliano *et al.*, 1996; Wang y Walsh, 2001, Wisdom *et al.*, 1991).

La preeclampsia es un síndrome clínico caracterizado por hipertensión con disfunción orgánica múltiple, proteinuria y edema. Se cree que es un trastorno endotelial que resulta de una perfusión deficiente de la placenta y está asociada con restricción de crecimiento y muerte intrauterina (Raijmakers *et al.*, 2004). La mayoría de sus causas son desconocidas, pero se piensa que el estrés oxidativo sería un factor fundamental en el desarrollo de la enfermedad, ya que las concentraciones de vitaminas C y E en el plasma materno se encuentran disminuidas y en la placenta existe un aumento de radicales libres y una disminución de las enzimas antioxidantes (Chappell *et al.*, 2002).

Durante la gestación normal, es indispensable tener una adecuada circulación placentaria. Al iniciarse el flujo sanguíneo hacia la placenta, comienza el aumento de la tensión de oxígeno local y el aumento en la actividad de varias enzimas antioxidantes. Una disminución de la respuesta antioxidante podría conducir a estrés oxidativo que llevarían a la degeneración trofoblástica y posiblemente contribuirían a defectos en la vascularización en la preeclampsia (Raijmakers *et al.*, 2004). Como se mencionó previamente, la hipoxia

induciría la formación de radicales libres, especialmente de EROS (Askew, 2002), lo que agotaría la capacidad antioxidante endógena, estableciéndose el estrés oxidativo. Es por eso que en la altura existe una mayor prevalencia de gestaciones que cursan con preeclampsia (Keyes *et al.*, 2003).

Exposición a alturas, lo cual es asociado con disminución en la presión de oxígeno, genera estrés oxidativo aumentando la generación de especies reactivas al oxígeno y nitrógeno (ERN), y a su vez se activan los sistemas generadores de ERN, tales como cadena transportadora de electrones, xantina oxidasa y óxido nítrico sintasa y esto es asociado a daño oxidativo en lípidos, proteínas y DNA (Dosek *et al.*, 2007).

En las grandes alturas al parecer se debilitan los sistemas antioxidantes tanto enzimáticos y no enzimáticos y el aumento de la ingesta nutricional de vitaminas antioxidantes permite reducir el daño oxidativo inducido por las altas alturas (Dosek *et al.*, 2007). La aclimatación involucra una regulación, aumentando las isoenzimas de óxido nítrico sintasa, sugiriendo que la hipoxia permite una alteración en el balance EROS/NO el cual es eventualmente restaurado durante el proceso de aclimatación (Dosek *et al.*, 2007).

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) son la gama de moléculas más susceptibles a las EROS. La degradación oxidativa de los PUFAs puede comprometer no sólo la matriz lipídica, si no que también la estructura y función de membrana asociada a proteínas como enzimas, receptores y transportadores, pero además la expresión de genes (Behn *et al.*, 2007). Por otra parte, el NO puede reaccionar con el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$) producido en las mitocondrias, generando el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) que se caracteriza por alta toxicidad celular (Gigante *et al.*, 2005).

Se han descrito tres isoformas para la NOS: neuronal (nNOS o tipo I) de masa molecular (MM) de 160 kDa, inducible (iNOS o tipo II) de masa molecular aproximadamente de 135 kDa y endotelial (eNOS o tipo III) de masa molecular de 140 kDa (Alderton *et al.*, 2003). De estas isoenzimas sólo la iNOS es activa a la concentración de Ca^{2+} intracelular basal, por lo que *in vivo* genera una mayor cantidad de NO (comparado con la otras isoformas)

siempre y cuando exista disponibilidad de sustrato. En la mayoría de los tejidos nNOS y eNOS son expresadas constitutivamente, mientras que iNOS es inducida por citoquinas pro-inflamatorias. En la placenta ovina se ha descrito actividad NOS, tanto dependiente de Ca^{2+} (eNOS y nNOS) como independiente de Ca^{2+} (iNOS) (Kwon *et al.*, 2004).

Las isoenzimas NOS son proteínas conformadas por dos dominios, el dominio oxidasa (N-terminal) y el dominio reductasa (C-terminal), los cuales están separados por un sitio central de unión a calmodulina. El dominio oxidasa contiene un grupo hemo tipo citocromo P-450 y un sitio de unión a BH_4 . El dominio reductasa contiene un dominio de transferencia de electrones que une FMN y FAD. Las NOS requieren para su activación unión a calmodulina y BH_4 y la formación de un homodímero. La unión a calmodulina, gatillada por la elevación transitoria de los niveles de Ca^{+2} libre intracelular, sirve como modulador alostérico de las isoformas de nNOS y eNOS. Éstas contienen 40 a 50 aminoácidos insertos en el medio del subdominio de unión a FMN que sirve como *loop* autoinhibitorio desestabilizando la unión a calmodulina a concentraciones bajas de Ca^{+2} e inhibiendo la transferencia de electrones desde FMN al sitio hemo, con lo cual se inhibe su actividad. Este inserto está ausente en la estructura de la iNOS, por lo tanto, puede producir NO independiente de la concentración de Ca^{+2} citosólico (Kone *et al.*, 2003).

Se ha descrito un marcado incremento en la concentración de arginina (sustrato esencial en la formación de NO) en fluido alantoideo ovino entre los días 30 y 60 de gestación (Kwon *et al.*, 2004). Este cambio temporal coincide con el período de más rápido crecimiento de la placenta ovina (Reynolds y Redmer, 1995).

Otro estudio en placenta ovina describe máximos de actividad de NOS y síntesis de NO en la primera mitad de gestación, sin embargo, también se describe un segundo máximo durante la gestación tardía (110-142 días) (Sheppard *et al.*, 2001), cuando hay un continuo incremento en el flujo sanguíneo feto-placentario (Kwon *et al.*, 2004). Este incremento en la síntesis de NO durante la gestación tardía podría jugar un rol importante en el aumento de transferencia de nutrientes y oxígeno desde los vasos maternos a los fetales para soportar el periodo de crecimiento más rápido de el feto (Kwon *et al.*, 2004).

Se sugiere que el NO, además de ser mediador de la vasodilatación, es un regulador del desarrollo placentario durante el tercer trimestre de gestación. Estos cambios parecen ser especialmente importantes entre los días 120 y 130 de gestación ovina (82%-90% de gestación), cuando la expresión de la eNOS y los niveles de GMPc se encuentran incrementados significativamente (Sheppard *et al.*, 2001).

En condiciones de normoxia, aproximadamente el 90% del oxígeno disponible es consumido por la mitocondria durante la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa. El ATP producido en este proceso lleva la energía a la vasta mayoría de procesos celulares activos. Así, la reducción química del oxígeno molecular es la fuente primaria de energía metabólica para todas las células; un suministro constante de oxígeno es crítico para la supervivencia y funcionamiento continuo de las células (Cormanc y Pouyssegur, 2007). Cuando el suministro de oxígeno es inferior al necesario, o la demanda de oxígeno excede el suministro se presenta una severa amenaza para el crecimiento celular, tejidos y supervivencia de organismos, pues niveles insuficientes de ATP impiden a la célula llevar a cabo sus funciones normales, conduciéndola a un estado de crisis metabólica (Cormanc y Pouyssegur, 2007).

La fosforilación oxidativa a su vez conlleva la generación de EROS. Por esto, excesivo o discontinuo consumo de oxígeno puede tener además consecuencias patológicas (Cormanc y Pouyssegur, 2007).

Los cambios en la presión parcial de oxígeno se detectan y controlan, para asegurar el suministro celular de oxígeno y evitar así los riesgos asociados al daño oxidativo y deficiencia de oxígeno (Brune y Zhou, 2007). La deficiencia de oxígeno es detectada por el factor transcripcional inducible por hipoxia (HIF-1), siendo una de las consecuencias el incremento del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Gigante *et al.*, 2005).

El HIF-1 está compuesto por dos sub-unidades: HIF-1 β expresada constitutivamente y HIF-1 α usualmente inestable. Este factor transcripcional es activo en estado dimérico

(HIF-1 β -HIF-1 α) en condiciones de hipoxia. En condiciones de normoxia, el factor transcripcional es inactivado a través de la hidroxilación de la subunidad HIF-1 α en residuos de prolina por la prolyl hidroxilasa (PHD), lo cual desencadena la ubiquitinación de la subunidad, en asociación con la proteína de von Hippel Lindau, degradándose finalmente vía proteosoma 26S. Así, este sistema responde a cambios en la tensión de O₂ lo que permite una adecuada respuesta adaptativa intracelular (Brune y Zhou, 2007).

La hipoxia prolongada incrementa los niveles de las EROS y genera un aumento compensatorio de NO, lo cual podría tener profundos efectos fenotípicos sobre la respuesta a la hipoxia a través de la HIF-1 (Brune y Zhou, 2007). Tasas de producción de NO y O₂⁻, como también la presencia de enzimas antioxidantes, pueden modular la estabilidad de la subunidad HIF-1 α (Brune y Zhou, 2007). Así, la exposición a hipoxia hipobárica parece involucrar estrés oxidativo, debido al aumento de lipoperoxidación, la cual aumentaría la demanda de la actividad antioxidante, en respuesta al daño generado (Vij *et al.*, 2005). Se ha detectado que para la preservación del contenido celular de los PUFAs bajo condiciones de hipoxia, el tratamiento con antioxidantes podría contribuir a mantener la composición de los ácidos grasos (Vij *et al.*, 2005).

La suplementación con antioxidantes, efectivamente, ha demostrado tener efectos preventivos, disminuyendo la intensidad del mal de montaña (Bordoni *et al.*, 2005). En la actualidad los antioxidantes se han usado de forma rutinaria en la formulación de raciones para diferentes especies domésticas por su efecto benéfico en disminuir el estrés oxidativo, logrando un mejor comportamiento productivo de los animales (Huerta *et al.*, 2005).

Estudios epidemiológicos indicaron que la restricción del crecimiento del feto y bajo peso al nacimiento son asociados a estrés oxidativo (Vonnahme *et al.*, 2005). Cabe destacar que, a gran altura la mortalidad neonatal de corderos oscila entre el 47 y 68% mientras que a baja altura no supera el 20% (Lanino, 1977). Esto toma mayor relevancia aún, si se toma en cuenta que para la población campesina andina, los ovinos son una importante fuente de alimentos, subproductos e ingresos económicos.

Schmidt *et al.* (2002) realizó un trabajo en humanos en el cual aplicó una mezcla de antioxidantes conteniendo vitamina E, beta caroteno, ácido ascórbico, selenio, n -acetil L-cisteína, entre otros, reduciendo el estrés oxidativo causado por la altitud. Una suplementación de vitamina E (40 mg por rata) ingeridas oralmente 5 días previo, y durante el periodo de exposición a hipoxia de altura (7576 m), atenuó significativamente la peroxidación lipídica inducida por las altas alturas (Ilavazhagan *et al.*, 2001).

Estudios realizados recientemente, indicarían que una administración oral diaria de vitamina C y E en ovejas gestantes, incrementaría significativamente los niveles plasmáticos de ambas vitaminas, casi dos veces más altos que en aquéllas que no fueron suplementadas (Parraguez *et al.*, 2011). Este estudio demuestra que al suplementar diariamente ovejas gestantes con vitamina C y E, se previenen los efectos de la hipoxia hipobárica en las características morfométricas afectadas y peso al nacer de los corderos.

La vitamina C es el primer antioxidante que actúa a nivel del plasma para poder contrarrestar los efectos de los radicales libres y la peroxidación lipídica (Padayatty *et al.*, 2002), mientras que la vitamina E es el antioxidante más eficaz que se encuentra en la naturaleza. Esta actúa protegiendo los ácidos grasos no saturados que se encuentran en la membrana de la célula, los cuales son de vital importancia para el funcionamiento y estructura de ésta (Landvik *et al.*, 2002).

En este trabajo se estudió el efecto del tratamiento antioxidante (vitaminas C+E) sobre diferentes características macroscópicas de la placenta, feto y la expresión y actividad de las isoenzimas NOS, en tejido placentario de ovejas, a los 100 días de preñez, en la condición de hipoxia hipobárica.

OBJETIVO GENERAL

Establecer el efecto de la administración de antioxidantes sobre la actividad NOS y la presencia de sus isoformas, en placenta de oveja que gesta bajo hipoxia hipobárica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Estandarizar las condiciones óptimas de detección de las isoformas de NOS mediante la técnica de *western blot*.
- 2.- Determinar la presencia de las isoenzimas eNOS, iNOS y nNOS en placentas de ovejas de 100 días de gestación en altura, con y sin tratamiento antioxidante.
- 3.- Comparar la actividad óxido nítrico sintasa (NOS) en placenta (materna y fetal) de ovejas gestantes en altura, con y sin tratamiento antioxidante.

MATERIAL Y MÉTODO

El estudio se realizó en el Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS) de la Universidad de Chile, ubicado en la localidad de Putre, XV región, a una altura de 3600 msnm, y en las dependencias de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

Se utilizaron 20 ovejas criollas de segundo parto con $42,6 \pm 3.4$ kg de peso, 10 de las cuales eran originarias del Valle Lluta a menos de 700 msnm ($18^{\circ}23'08''S$, $70^{\circ}08'53''W$), y las otras 10 ovejas fueron originarias de la localidad de Putre, ubicado sobre los 3550 msnm ($18^{\circ}11'48''S$, $69^{\circ}33'11''W$), 128 Km al este de Arica. Todas las hembras fueron encastadas con carneros de fertilidad probada. El diagnóstico de gestación fue realizado mediante ecografía a los 16-20 días desde el encaste. Una vez confirmada la preñez, las ovejas fueron trasladadas al Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS), donde cursaron su preñez hasta el día de la toma de muestras, aproximadamente al día 100 de gestación.

Las ovejas se distribuyeron en los siguientes grupos: LH, ovejas nativas del nivel del mar (Valle Lluta), subidas a desarrollar su gestación en altura (Putre); LHV, semejante al grupo anterior más la administración diaria de suplemento vitamínico; HH, ovejas nativas de la altura (Putre), que desarrollaron su gestación en altura y HHV, semejante al grupo anterior más la administración diaria de suplemento vitamínico.

Las hembras recibieron diariamente 2 kg de heno de alfalfa por animal, cantidad de alimento calculada para ovejas en el último tercio de gestación por la NRC (*National Research Council*). Junto al forraje, los grupos suplementados recibieron vitamina C (500 mg/animal/día) y vitamina E (350 UI/animal/día) desde el día 20 de preñez, hasta el final del experimento. Esta dosis de vitamina C y E han sido probadas en ovejas para la reversión de los efectos del estrés oxidativo inducido por hipoxia de altura (Parraguez *et al.*, 2011)

Protocolo de obtención de muestras:

La obtención de muestras se realizó a los 100 días de gestación. Las ovejas fueron anestesiadas profundamente (Tiopental sódico 20 mg/Kg) para realizar posteriormente una laparotomía media infraumbilical y poder así abordar el útero. Se extrajo una muestra sanguínea de 1 mL desde arteria uterina para la medición de presión parcial de oxígeno (PO₂), presión parcial de dióxido de carbono (PCO₂), hematocrito (Ht), hemoglobina (Hb), saturación de hemoglobina por oxígeno (SatHb) y pH, utilizando un analizador de gases de IL Synthesis 25TM (*Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, U.S.A*). Sumado a esto, se extrajeron 3 mL desde arteria uterina, vena y arteria umbilical para hacer medición de la concentración plasmática de vitamina C y E.

Posteriormente, se realizó una histerotomía, en la cual se sacrificó al feto mediante sobredosis barbitúrico e inmediatamente se sacrificó a la madre con sobredosis del anestésico. Luego se instalaron catéteres en la arteria uterina y vasos umbilicales para proceder a la perfusión de la placenta de la oveja con 4 L de tampón fosfato 0,2 M pH 7,4 lo cual permite que la estructura placentaria pierda el contenido sanguíneo y se obtengan muestras limpias.

Se extrajeron cuatro placentomas de iguales características, los que fueron disecados para la separación de los componentes materno y fetal, los que fueron congelados en N₂ líquido (-196 ° C) para su traslado al laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, donde se almacenaron a -80° C para la posterior determinación de las isoformas de NOS mediante *western blot*.

Los métodos a utilizar fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile y por el Comité Asesor de Bioética del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico FONDECYT.

Preparación de homogeneizados de Placenta:

Se pesó entre 0,5 y 1 g de tejido placentario y se homogeneizó en dos volúmenes de solución amortiguadora que contenía Tris-HCl 50 mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, β -Mercaptoetanol 12 mM, Leupeptin 2 μ M, Pepstatin 1 μ M, Fenilmetilsulfonil fluoruro 1 μ M. El homogeneizado fue obtenido en un homogenizador tipo Utraturrax a 10.000 r.p.m., tres veces por 15 segundos. Ambos procedimientos se realizaron en un baño de hielo. Luego los homogeneizados fueron centrifugados a 1500xg por 20 minutos, para finalmente alicuotar y almacenar la fracción sobrenadante a -20° C, para su posterior análisis.

Determinación de proteína:

Se determinó la concentración de proteínas totales de cada muestra de homogeneizado utilizando el método espectrofotométrico de *Lowry* (*Lowry et al.*, 1951). Para realizar la curva de calibración de concentración de proteína se utilizó como patrón o estándar albúmina sérica bovina (BSA 1 mg/mL), en un rango de 5 a 50 μ g de proteína. Las muestras homogeneizadas fueron diluidas en una relación 1:4 con agua destilada, leyendo su absorbancia a 750 nm, en un espectrofotómetro UNICAM UV/ *Vis Spectrometer*.

Detección de las isoformas de NOS: eNOS, iNOS, nNOS en tejido placentario ovino a través de *Western Blot*:

Las proteínas de cada homogeneizado fueron separadas de acuerdo al método de Laemmli (1970) usando una electroforesis en gel de poliacrilamida (8%) con dodecilsulfato sódico (*SDS-PAGE*) en condiciones reductoras y desnaturalizantes, a un voltaje constante de 150 volt durante 90 minutos. En un bolsillo del gel se cargó una mezcla de marcadores de masa molecular comercial, desde 7 a 193 kDa (Bio Rad®), luego las muestras conteniendo 70 μ g de proteína por bolsillo y un homogeneizado de células endoteliales de arteria umbilical (*Zheng et al.*, 1998; *Zheng et al.*, 1999) y tejido nervioso (cerebelo de oveja) (*Wood et al.*, 2005) como control positivo para eNOS y nNOS, respectivamente.

A continuación, las proteínas presentes en los geles fueron transferidas a una membrana PVDF (*Inmun-Blot*, Bio-Rad®) por medio de una electrotransferencia, que se realizó a 0,35 A constante por 2 horas en un baño de hielo. Posteriormente, las membranas fueron bloqueadas durante 60 minutos en una solución TBS-leche-*Tween* 20 (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM, leche descremada 6% y *Tween*-20 0.05 %), en agitación constante, con el fin de evitar la interacción inespecífica de anticuerpos. Luego fueron sometidas a tres lavados consecutivos en agitación, cada uno de 10 minutos en una solución TBS-*tween* 20 (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM y *Tween*-20 0,05%), para luego ser incubadas durante toda la noche a 4°C con anticuerpos anti-nNOS (anticuerpo monoclonal, generado para nNOS de ratón, número de catálogo N31020-50, *Transduction Laboratories*®), anti-iNOS (anticuerpo policlonal, generado para iNOS de conejo, NOS2 N-20: sc-651 Santa Cruz *Biotechnology*®) y anti-eNOS (anticuerpo monoclonal, generado para eNOS de humano, número de catálogo N30020-50, *Transduction Laboratories*®), en una solución de TBS-leche-*tween* 20. Con el objeto de determinar la dilución óptima de anticuerpo se probó un rango de dilución desde 1:250 a 1:4000 para cada uno de los anticuerpos primarios. Para los anticuerpos anti-iNOS y anti-eNOS se utilizó una dilución de 1:250, mientras que para el anticuerpo anti-nNOS 1:4000.

Posteriormente, se realizó una segunda etapa de lavado de las mismas características de la anterior y se incubaron las membranas durante 1 hora, en agitación con anticuerpo secundario anti-*rabbit* IgG conjugado con peroxidasa de rabanito (HRP) (sc-2030 Santa Cruz *Biotechnology*®, CA, U.S.A) en solución de TBS-leche-*tween* 20. Se realizó una última etapa de lavado, para luego revelar con luminol sustrato (*ECL, Plus Western Blotting Substrate*, *Pierce*®) que genera un producto quimioluminiscente por acción de la peroxidasa. La reacción positiva se evidenció a partir de bandas luminosas cuya intensidad de luz estuvo en directa relación a la cantidad de isoenzima presente en la muestra. Luego, las membranas fueron expuestas a películas fotosensibles (CL-X *Posture*®, *Pierce*®), donde quedaron registradas en escala de grises a negro las diferencias de intensidad de luz de cada muestra. Este registro se utilizó para realizar un análisis densitométrico.

Para la detección de la molécula iNOS, se realizó la técnica de *Dot Blot*, en la cual se aplicaron las muestras directamente sobre la membrana PVDF, permitiendo cargar mayores concentraciones de proteína. Luego la membrana se sometió al mismo sistema de detección con los anticuerpos descritos anteriormente.

Como patrón normalizador de las condiciones experimentales se detectó la proteína estructural β -actina, la cual se incubó en forma paralela a las NOS, según Fagan *et al.* (2001).

Densitometría:

La densitometría permitió realizar una estimación cuantitativa de las isoenzimas de NOS presentes en el tejido placentario ovino (porción materna y fetal por separado). Para ello, cada film fotosensible fue escaneado y analizado mediante el programa computacional UNI-SCAN-IT gel versión 4.1 (*Silk. Scientific Corporation*, Utah, EEUU), el cual cuantificó el número de píxeles (unidades densitométricas) de cada banda o punto correspondiente a cada muestra. Luego se estableció una razón entre unidades densitométricas registradas para las isoenzimas NOS y lo registrado para la β -actina de cada muestra de tejido placentario, representando las unidades relativas (UR). Con esto se logró corregir posibles variaciones introducidas por la manipulación metodológica.

Determinación de la actividad óxido nítrico sintasa (NOS):

Se determinó la actividad NOS total dependiente de Ca^{2+} (eNOS y nNOS) y la de iNOS independiente de Ca^{2+} , en homogeneizados de tejido placentario, de acuerdo al método de conversión de [^3H]-arginina a [^3H]-citrulina descrito en Bredt y Snyder (1990), con algunas modificaciones descritas por Galleguillos *et al.* (2001).

Para establecer la especificidad de la reacción, en experimentos paralelos se usaron los siguientes inhibidores: 3 mM de L-NAME, 0,5 mM de trifluoperazina y 5 mM de valina.

Se realizaron diferentes ensayos en los cuales no se adicionaron los cofactores tetrahidrobiopterina (BH_4), nicotinamida adenina dinucleotido difosfato (NADPH) y otro en

donde sólo se usó medio de reacción y tejido, como patrones de control, para así poder determinar claramente la actividad de la NOS, o bien identificar la presencia de alguna otra enzima.

La reacción se realizó a 37° C por 60 minutos y fue detenida con 1,8 mL de HEPES 30 mM (pH 5,5) y con EDTA 3 mM. La separación de arginina de la citrulina se realizó a través de cromatografía de intercambio iónico en 1 mL de resina *Dowex* (*SIGMA*®). diluída al 50 % p/v. La [³H]-citrulina formada fue recolectada en viales de 20 mL con 9 mL de líquido de centelleo (*Ecoscint*®), posteriormente fue cuantificada mediante un contador de centelleo líquido (*Packard Tri-carb 1600 TR, Packard*®). La actividad enzimática se expresó en pmoles de citrulina/minuto x mg de proteína total.

Determinación de vitamina E y C en plasma

Las concentraciones de vitaminas fueron medidas a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, *Waters Alliance 2695, Waters Corporation, Milford, MA, USA*). La vitamina C fue medida a través de HPLC con detección amperométrica (*Waters 464, Waters Corporation, Milford, MA, USA*), de acuerdo con el método descrito por Pachla y Kissinger (1979). Previamente, las muestras de plasma materno fueron diluidas 10 veces en agua ultra pura, homogeneizada, y filtrada a través de una membrana de poros de 0,45 µm. Las condiciones de cromatografía fueron las siguientes: una columna analítica 250 x 4,6 mm (*Symetry Shield C18, 5 µm; Waters, MA, USA*); una fase móvil (ácido metafosfórico g/L, agua ultra pura) con una velocidad de flujo de 1 mL/min; volumen de inyección 10 µL; temperatura de trabajo de 30° C. El detector fue equipado con un electrodo de vidrio de carbono que operó a 800 mV y con un electrodo de referencia Ag/AgCl. La concentración de vitamina E fue medida por HPLC con detección fluorescente (*Waters 2475, Waters Corporation, Milford, MA, USA*) de acuerdo al método de Zhao *et al.* (2004). Para la extracción de vitamina E, las muestras plasmáticas (100 µL) fueron diluidas 1:1:6 en etanol y diclorometano, respectivamente, luego fueron centrifugadas y el sedimento fue secado bajo una atmósfera de nitrógeno. El extracto seco fue reconstituido en metanol (200 µL). Las condiciones de cromatografía fueron las siguientes: una columna analítica de 150 x 4,6 mm (*Symetry C18, 5 µm; Waters, MA, USA*), una fase móvil (*Methanol HPLC 100%*) una velocidad de flujo de 1

mL/min; volumen de inyección de 20 μ L, temperatura de trabajo de 30° C. El espectrofluorímetro funcionó con una longitud de onda de excitación de 290 nm y de emisión 330 nm.

Estos análisis fueron realizados por un laboratorio externo especializado IADET.

Análisis Estadístico:

Los resultados obtenidos para cada característica fueron comparados mediante ANDEVA, considerando el “origen” de los animales y “tratamiento con vitaminas” como factores de variación y la interacción de ambos. Se utilizó el programa *Statistical 7*. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$. Cuando los ANDEVA resultaron significativos, se realizaron comparaciones a *posteriori* para identificar los grupos distintos.

RESULTADOS

1- Efecto del tratamiento antioxidante sobre gases sanguíneos en Arteria Uterina (AUT) de ovejas con 100 días de gestación bajo hipoxia hipobárica

En la Tabla N°1 se presentan los valores promedio \pm D.E. de los gases sanguíneos de los 4 grupos experimentales. En todos los grupos se observa un estado hipoxémico sin embargo, la PO₂ presentó valores significativamente mayores en los grupos que fueron suplementados con antioxidantes. El grupo que obtuvo la menor PO₂ fue aquél con corta residencia en altura LH, presentando una diferencia significativa en comparación con el de larga residencia en altura HH. El hematocrito (Ht) fue menor en ambos grupos de animales suplementados. La concentración de hemoglobina (Hb) se mantiene constante en todos los grupos, siendo de menor valor en el grupo HHV. El pH presentó un leve pero significativo aumento en el grupo adaptado a la hipoxia luego de recibir terapia antioxidante.

Tabla 1: Gases sanguíneos medidos en Arteria Uterina (AUT) a los 100 días de gestación (Promedios \pm D.E)

Grupo	PaO ₂ AUT (mmHg)	PaCO ₂ AUT (mmHg)	Ht AUT (%)	Hb AUT (mg/dL)	SatHb AUT (%)	pH AUT
HH	58,0 \pm 1,0 ^a	23,8 \pm 0,8	38,5 \pm 0,7 ^b	13,4 \pm 1,0	82,3 \pm 1,1	7,43 \pm 0,01 ^a
HHV	62,5 \pm 0,7 ^b	26,9 \pm 0,1	32,5 \pm 2,7 ^a	11,1 \pm 0,1	85,6 \pm 3,1	7,49 \pm 0,00 ^b
LH	46,5 \pm 0,7 ^c	18,8 \pm 2,8	40,3 \pm 0,7 ^c	13,7 \pm 1,4	75,4 \pm 1,0	7,38 \pm 0,10 ^a
LHV	55,3 \pm 5,5 ^d	25,8 \pm 5,3	38,5 \pm 0,7 ^b	13,0 \pm 1,0	80,6 \pm 1,6	7,39 \pm 0,04 ^a

Letras distintas indican diferencia significativa entre grupos ($p \leq 0,05$). PaO₂: Presión parcial de O₂; PaCO₂: Presión parcial de CO₂; Hb: Hemoglobina; SatHb: Saturación de Hb; Ht: Hematocrito.

2- Efecto del tratamiento antioxidante sobre las concentraciones sanguíneas de vitamina C y E en ovejas con 100 días de gestación, bajo hipoxia hipobárica.

El tratamiento con antioxidantes mostró un aumento estadísticamente significativo sobre las concentraciones plasmáticas en los grupos de animales suplementados HHV y LHV (Gráficos 1 y 2).

Vitamina C en plasma sanguíneo



Vitamina E en plasma sanguíneo



Se realizaron mediciones de los pesos fetales, los cuales también presentan variaciones significativas en ambos grupos suplementados con terapia antioxidante, siendo los fetos de menor peso aquéllos que provienen de ovejas originarias del bajo, pero que gestaron en altura sin administración de vitaminas antioxidantes (LH) (Gráfico N°3).

Peso Fetal



3- Estandarización de las condiciones óptimas de detección de las isoformas de NOS mediante *western blot*

Para la detección de eNOS en las muestras obtenidas fue necesario realizar una etapa previa de estandarización de esta metodología, con el fin de determinar las mejores condiciones de trabajo. Lo primero fue establecer las condiciones de electrotransferencia, variando tiempo y amperaje, con el objetivo de asegurar la completa transferencia de las moléculas NOS a la membrana. Para comprobar lo anterior fue necesario realizar en un conjunto de muestras una electrotransferencia con doble membrana. Posteriormente, el gel de electroforesis fue sometido a una tinción con azul de *Coomassie*, comprobándose la total transferencia de proteínas, siendo el gel negativo a la tinción de *Coomassie*. Las membranas fueron incubadas con anticuerpo anti e-NOS (ver material y método), con resultados negativos a la presencia de proteínas en la segunda membrana lo que indicó la

total transferencia a la primera membrana. De esta manera se decidió realizar la electrotransferencia a 350 mA en 120 minutos.

Otro parámetro a establecer fue el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, para la detección de eNOS. Éste fue de 120 minutos y su dilución óptima (1:250). En forma paralela se determinó que los mejores resultados se obtuvieron al cargar 70 µg de proteína total de cada muestra, o bien el máximo que permitiese cargar cada bolsillo del gel de electroforesis.

Con la finalidad de obtener un control positivo de eNOS de oveja, se decidió tomar una muestra de tejido de arteria umbilical. Esta muestra fue homogeneizada y analizada mediante *western blot* en las mismas condiciones que los homogeneizados de placenta ovina. En la figura 1 y 2 se observa que tanto el control positivo como los homogeneizados de tejido placentario presentan una banda de 140 kDa (muestras representativas de los *western blot* analizados).

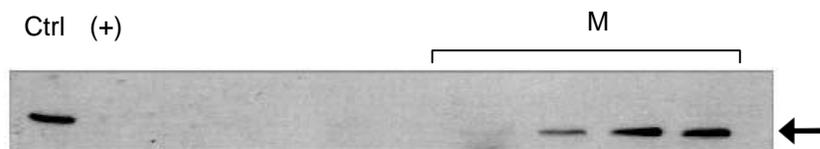


Figura 1: Análisis *western blot* para la isoenzima eNOS

Western Blot de las muestras de tejido placentario de la porción materna (M) (70 µg de proteína total), se analizaron con anticuerpo monoclonal anti-eNOS. Se muestra el control positivo (Ctrl(+)). La flecha indica una banda de 140 kDa.

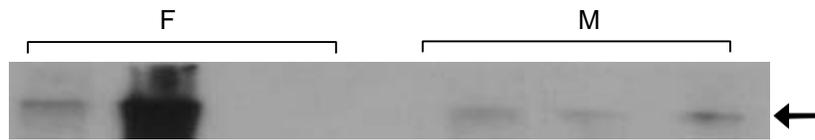


Figura 2: Análisis *western blot* para la isoenzima eNOS, porción materna y fetal.

Western Blot de las muestras de tejido placentario de la porción fetal (F) y materna (M) (70 μ g de proteína total), analizadas con anticuerpo monoclonal anti-eNOS. La flecha indica una banda de 140 kDa.

4- Efecto del tratamiento antioxidante sobre la presencia de isoformas de óxido nítrico sintasa en placenta ovina a los 100 días de gestación bajo hipoxia hipobárica.

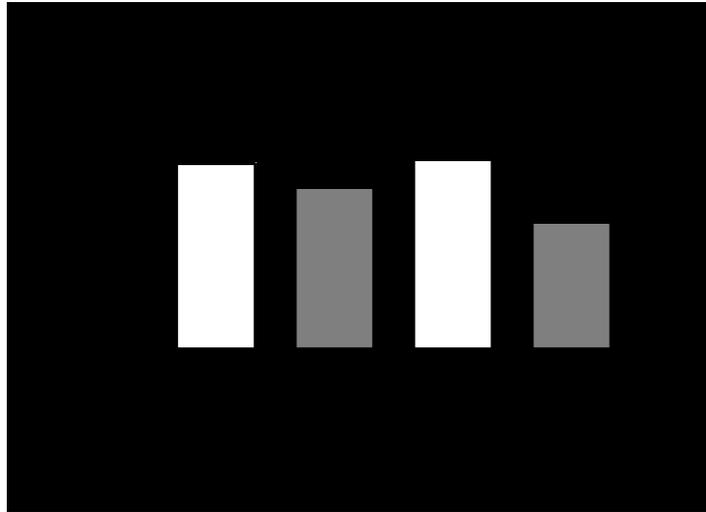
Detección de eNOS: La eNOS fue detectada en tejido placentario materno y fetal. En el primero, placenta materna, se puede apreciar que los grupos tratados con antioxidantes presentan una disminución en la expresión de la proteína, siendo el grupo LHV el único que muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) con respecto a los otros grupos estudiados, como se aprecia en el gráfico N° 4.

Placenta Materna



En el gráfico N°5 se aprecia que no existe una variación significativa en la expresión de eNOS en la placenta fetal dentro de los grupos estudiados.

Placenta Fetal



Detección de iNOS y nNOS: En los tejidos placentarios analizados (materno y fetal) mediante la técnica de *western-blot*, no fueron detectadas las isoformas de iNOS y nNOS. Con el fin de aumentar la sensibilidad de esta metodología se realizaron varios ensayos, modificando diferentes condiciones.

- Dilución del anticuerpo: el anticuerpo utilizado fue probado con distintas concentraciones llegando a la de 1:250 para nNOS y 1:4000 para iNOS.
- Concentración de proteína de los homogeneizados de placenta ovina: en cada gel se cargaron cantidades crecientes de proteína, desde 40 µg de proteína total de muestra hasta un máximo posible a cargar dado por las características del equipo de electroforesis, que fue de 70 µg.
- Tiempo de incubación: las membranas fueron incubadas por separado con Ac anti-nNOS y anti-iNOS con una variación de tiempo desde dos horas hasta incubación de toda la noche a 4°C.

- Control positivo: Como control positivo para nNOS se utilizó corteza cerebral de oveja, el cual fue detectado por el anticuerpo anti-nNOS, como se muestra en la figura 3, con una masa molecular de 160 kDa.



Figura 3: Análisis *western blot* para la isoenzima nNOS

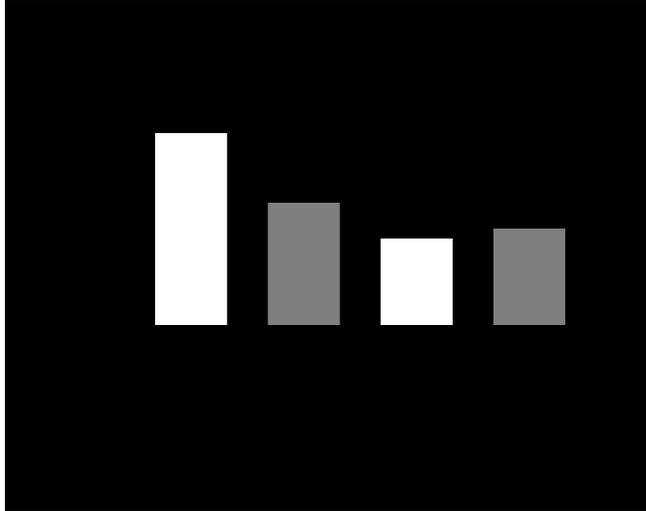
Western blot de las muestras de tejido placentario de porción fetal (F) y materno (M). En cada carril se cargaron 70 μ g de proteína, no siendo detectada la molécula. TN corresponde a un control positivo de cerebelo de feto de oveja. La flecha indica masa molecular de 160kDa.

5- Efecto del tratamiento antioxidante sobre la actividad de la óxido nítrico sintasa en placenta ovina a los 100 días de gestación bajo hipoxia hipobárica.

En todas las muestras analizadas se detectó la actividad de NOS dependiente de Ca^{+2} y calmodulina. No se detectó la actividad independiente de Ca^{+2} , correspondiente a la iNOS, para ninguna de las estructuras estudiadas.

El gráfico N°6 nos muestra la actividad NOS dependiente de Ca^{+2} y calmodulina en placenta materna, la que no presentó diferencias significativas entre los grupos.

Actividad NOS en placenta materna



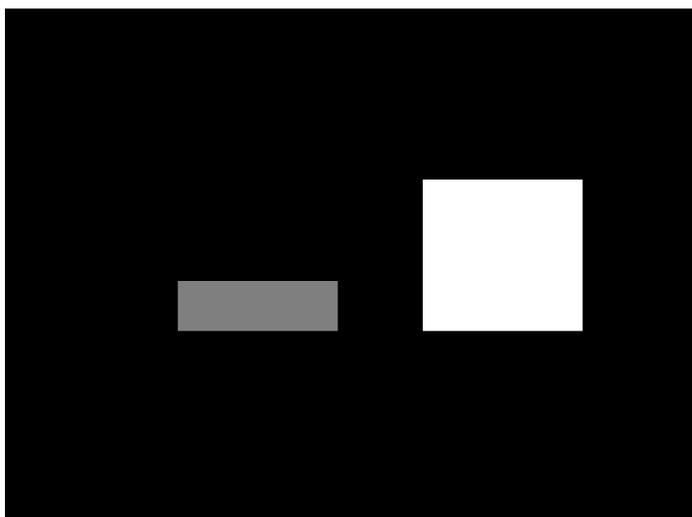
En la porción fetal se puede apreciar una tendencia de mayor actividad, dependiente de Ca^{+2} y calmodulina, en los grupos suplementados con tratamiento antioxidante, siendo este aumento estadísticamente significativo ($p \leq 0,05$) para el grupo HHV como se representa en el gráfico N°7.

Actividad NOS en placenta fetal



El Gráfico N°8 presenta la comparación de la actividad NOS entre la porción materna y la porción fetal, exhibiendo una diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) en favor de la porción fetal.

Actividad NOS en placenta de oveja



DISCUSIÓN

La exposición a la altura genera diversos cambios fisiológicos, los que se hacen más evidentes en organismos que llevan menos tiempo de adaptación en comparación a los que han habitado por generaciones en esta condición. Uno de los estados fisiológicos de mayor riesgo al exponerse a la altura es la gestación, debido a que durante la preñez existe una mayor demanda de oxígeno para el normal desarrollo fetal.

Como se ha visto en diversos estudios (De Carolis, 1987; Moore, 2003; Parraguez *et al.*, 2006), la adaptación a la altura se ve reflejada en bajos índices reproductivos y productivos en comparación a gestaciones que se desarrollan a nivel del mar.

En esta memoria se estudiaron los efectos de la administración de vitaminas antioxidantes sobre la prevención de cambios atribuidos al estrés oxidativo y sus consecuencias sobre algunas características placentarias y fetales indeseables. Es comúnmente aceptado que los rumiantes sintetizan su propia vitamina C para satisfacer sus necesidades diarias. Sin embargo, bajo ciertas condiciones de estrés ambiental es necesaria la suplementación exógena para evitar los efectos de deficiencia de vitamina C (Black y Hidiroglou, 1996). Hidiroglou (1999), demostró un incremento significativo en las concentraciones plasmáticas de vitamina C en vacas después de su administración, coincidiendo con lo encontrado por Parraguez *et al.* (2011), indicando que administraciones diarias de vitamina C, en ovejas gestantes, a través de un largo periodo (150 días) incrementa significativamente las concentraciones plasmáticas de esta vitamina. Esto es concordante con lo observado en el presente estudio.

En el caso de la vitamina E, el incremento observado en sus concentraciones plasmáticas en ovejas suplementadas, tiene un comportamiento similar a lo encontrado para la vitamina C, concordando también con lo observado por Parraguez *et al.* (2011).

El incremento de las concentraciones plasmáticas de vitaminas en ovejas suplementadas, es de importancia considerable en términos de transferencia de vitaminas al feto. En

efecto, el resultado del crecimiento fetal y peso al nacimiento tienen una relación directa entre las concentraciones plasmáticas de vitamina E de la madre y del recién nacido (Capper *et al.*, 2005; Parraguez *et al.*, 2011), lo que podría reflejar una transferencia transplacentaria de esta vitamina.

A nivel de mar, la presión barométrica es de 760 mm Hg, el oxígeno corresponde al 21% del gas atmosférico, por lo que tiene una presión parcial de 160 mm Hg. La presión parcial del oxígeno en el alveolo pulmonar es aproximadamente 100 mm Hg, la presión parcial de oxígeno arterial es de 95 mm Hg y el rango de saturación de la hemoglobina por oxígeno se encuentra entre 95 y 100%. Al aumentar la altura desde el nivel del mar, la presión barométrica cae, la presión de oxígeno entre el alveolo y los capilares desciende, cayendo también la diferencia de presión de oxígeno entre el alveolo y los capilares pulmonares, provocando una disminución en la fuerza para la difusión del gas a través de la membrana alveolar. Como consecuencia, la presión de oxígeno arterial baja a cerca de 50 mm Hg a 4000 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m) y la saturación de hemoglobina por oxígeno cae a alrededor de 80% (Krampl, 2002).

En concordancia con lo anterior, los animales evidenciaron un estado hipoxémico esperado en todos los grupos estudiados. La PO_2 presentó aumentos estadísticamente significativos entre animales suplementados, en comparación con los que no fueron sometidos al tratamiento antioxidante, siendo estos resultados similares a los encontrados por Parraguez *et al.* (2011) a los 110-120 días de gestación. Se ha demostrado que la exposición a hipoxia aguda o crónica, así como también a estrés oxidativo, inducen daño tisular en el pulmón y disminución en el intercambio de gases (Tuder *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009). Las diferencias observadas en la presión de oxígeno y la saturación de hemoglobina en respuesta a la terapia antioxidante podría ser explicado por una disminución en el daño pulmonar al disminuir el estrés oxidativo, lo que proveería una mayor oxigenación al feto, contribuyendo al incremento del peso de los fetos.

Los valores de hematocrito (Ht) fueron más altos en los grupos LH y HH en comparación con los grupos suplementados con vitaminas. Como ha sido descrito en algunos estudios realizados en humanos, también en gestaciones de altura el Ht está aumentado, como

forma de adaptación a la condición de hipoxia, la que representa un estímulo que incrementa la producción de eritrocitos (Ballew y Haas, 1986). El efecto de las vitaminas puede ser explicado de igual forma que para el caso de la PO_2 y la SatHb.

Las diferencias en el peso fetal y estructuras placentarias entre ovejas normóxicas e hipóxicas se vuelven particularmente evidentes en preñez avanzada (Jacobs *et al.*, 1988), sugiriendo que la limitación en los niveles de oxígeno influye mucho más al final de la gestación, donde la masa fetal se incrementa rápidamente. De acuerdo a lo encontrado por Jacobs *et al.* (1988), en gestaciones expuestas a un periodo largo de hipoxia hipobárica (~30 días o más), disminuye el tamaño promedio de los cotiledones, sin embargo se mejora el peso fetal, lo que podría concluir que los fetos de ovejas incrementan su habilidad para adquirir y transportar oxígeno en respuesta a hipoxia crónica, pero esta compensación no es suficiente para prevenir el retardo del crecimiento del feto o de los tejidos.

En el presente estudio se aprecia que el tratamiento antioxidante mejora los pesos fetales. Las madres utilizan un mecanismo de defensa contra el estrés oxidativo en la gestación, compuesto por enzimas antioxidantes y nutrientes entre los cuales se incluyen las vitaminas C y E. Esta idea se asocia con lo propuesto por Lee *et al.* (2004), quienes encontraron que las concentraciones plasmáticas de vitamina C en mujeres embarazadas durante el segundo trimestre de gestación estaban positivamente correlacionadas con los pesos al nacimiento de los recién nacidos. Además, estos autores sugieren que las concentraciones plasmáticas de vitaminas C y E juntas en plasma materno representarían el mejor estatus de antioxidantes en la gestación, ya que estas vitaminas, actuarían de manera sinérgica ante el estrés oxidativo.

Parraguez *et al.* (2004) describieron que los corderos nacidos de madres nativas de altura, en términos absolutos, presentan 200 g más de peso al nacimiento que aquéllos nacidos de madres provenientes del nivel del mar y que gestaron en altura. La restricción del crecimiento intrauterino en la altura es una consecuencia de la reducción de oxígeno que llega al feto y una de las causas, según Moore (2003), del aumento en la incidencia

de preeclampsia. Sin embargo, como se describió posteriormente, la hipoxia y el estrés oxidativo actúan de manera conjunta para disminuir el peso fetal (Parraguez *et al.*, 2011). Esto es coherente con nuestros resultados.

En este trabajo se observó claramente la expresión de eNOS en placenta, siendo mayor la expresión de ésta en la porción materna. La terapia antioxidante disminuyó significativamente la expresión de eNOS en la placenta materna y tuvo una tendencia similar en la porción fetal, pero sin significación estadística.

Zheng *et al.* (2000), realizaron un estudio de la expresión de iNOS y eNOS en placenta de oveja, específicamente en carúncula, cotiledón, espacio intercotiledonario y espacio intercaruncular; a través de *western blot* e inmunohistoquímica. Estos autores describieron mayor presencia de eNOS en la porción fetal del placentoma, principalmente en células endoteliales, grandes arterias y microvasos (arteriolas, vénulas y capilares). Esto concuerda con lo descrito por Alegría (2010), pudiendo ser éste un importante factor en la mantención del tono vascular y la presión de perfusión, lo que favorecería el periodo de mayor crecimiento fetal. Esto no concordaría con los resultados obtenidos en el presente estudio, pudiendo deberse esta diferencia al área de extracción de muestra del cotiledón.

En cuanto a la iNOS, este estudio no detectó la presencia de la enzima, ni actividad asociada a ésta, lo que concordaría con otros estudios realizados en placenta de oveja, donde por inmunotinción se detecta en el espacio intercotiledonario e intercaruncular, principalmente en epitelio glandular, lumen y células del estroma (Zheng *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2004).

Tanto la eNOS como la iNOS son expresadas en la placenta de muchas especies, incluidos humanos, monos, cerdos, ratas y ovejas (Myatt *et al.*, 1991; Zarlingo *et al.*, 1997). Debido a la similitud de la localización de las proteínas estudiadas y avalados por estudios anteriores (Zheng *et al.*, 2000) se escogieron los anticuerpos utilizados. Si bien para iNOS, no contábamos con control positivo, se utilizó anticuerpo policlonal generado

para iNOS de conejo ya que no existe en el mercado un anticuerpo cuya reactividad esté verificada para la especie ovina, por lo tanto, su elección se basó en la alta homología de la isoenzima NOS II entre las diferentes especies, lo que sugiere que la ausencia en la detección de la isoforma no se debería a inconvenientes metodológicos.

Expresión de iNOS ha sido observada en células endoteliales de venas umbilicales de humanos (Cho *et al.*, 1999), como también en aorta de rata (Zhang *et al.*, 1999) y células endoteliales de mamíferos (Onoda y Inano, 1998) por una variedad de métodos, incluyendo inmunohistoquímica. Sin embargo, en este trabajo sólo se detectó eNOS, pero no la iNOS, en células endoteliales de arterias placentarias, lo que es consistente con estudios previos realizados en endotelio de arteria uterina de oveja (Vagnoni y Magnnes, 1999; Vagnoni *et al.*, 1999; Zheng *et al.*, 2000). Estas observaciones sugieren a la eNOS como la isoforma predominante de NOS en endotelio uterino y placenta ovina durante la gestación tardía. Esto tiene un valioso sentido, pues la iNOS al ser una isoforma que no requiere determinadas concentraciones de Ca^{+2} , ni tampoco calmodulina para su acción, generaría mayores concentraciones de NO a nivel fetal, lo que si bien hasta cierto punto favorece su desarrollo, podría también ser un generador de estrés oxidativo adicional.

Tampoco se detectó presencia de nNOS por *western blot* en tejido placentario, ni fetal ni materno, lo que concuerda con lo descrito por Alegría (2010), quien trabajó muestras del mismo tejido analizado por nosotros, donde por inmunotinción tampoco detectó la presencia de esta enzima. La nNOS ha sido caracterizada y purificada desde cerebelo de ratas, porcinos y llamas (Forstermann *et al.*, 1998; Galleguillos *et al.*, 2001). Sin embargo, la expresión de la nNOS no está confinada sólo a células nerviosas (Forstermann *et al.*, 1998); también se ha descrito en una variedad de tejidos en mamíferos, tales como músculo esquelético, riñón, pulmón, testículos, piel y glándulas adrenales (Forstermann *et al.*, 1998), no así en placenta.

A su vez, Al-Hijji *et al.* (2003), quienes realizaron mediciones de las NOS por *western blot* y actividad de estas isoenzimas en trofoblasto humano, tejido uterino y placenta, concuerdan con nuestro estudio, al no encontrar la isoenzima nNOS y detectando mayor

actividad NOS dependiente de Ca^{+2} en la porción fetal, concordando inclusive con los rangos de valores de actividad determinada. Cabe destacar que el estudio realizado por Al-Hijji *et al.* (2003), fue efectuado en tejido uterino y placentario en fracción citosólica y fracción microsomal, a diferencia de este ensayo el cual se realizó solo en un homogeneizado, detectando mayor proporción de isoenzima y mayor actividad en la fracción microsomal, lo que nos entrega información del porqué de las dificultades que tuvimos para estandarizar las técnicas a utilizar, pues creemos que la proteína en sí se diluyó demasiado en el homogeneizado, lo que hace más difícil su detección.

La actividad NOS dependiente de Ca^{+2} y calmodulina (expresada como pmoles de citrulina formada por minuto por miligramo de proteína total) fue mayor en la porción fetal, en comparación a la porción materna, siendo este resultado concordante con lo detectado por Zheng *et al.* (2000), donde se describe que la producción de NO es más alta en tejidos placentarios fetales, específicamente cotiledón, que en cualquier otro tejido útero - placentario (carúnculas, espacio intercaruncular, espacio intercotiledonario), lo que se relacionó directamente con la actividad NOS. A su vez, en ese mismo trabajo se describe la producción de NO directamente asociado a la enzima eNOS y no a la iNOS, concordando también con lo encontrado en este estudio por *western blot*, y en donde no hubo detección de actividad NOS independiente de Ca^{+2} (iNOS). Además, en la porción fetal de la placenta se detectó mayor actividad NOS en los grupos suplementados con vitaminas antioxidantes, siendo esta actividad significativamente mayor en las ovejas nativas de altura. Datos preliminares de nuestro Laboratorio muestran para animales que gestan a nivel del mar una actividad NOS en la porción fetal casi un tercio de lo hallado en la porción fetal de nuestro estudio. Esto lo podríamos atribuir a un efecto compensatorio en el cotiledón (porción fetal) frente a la hipoxia hipobárica, el que parece mejorar con el tratamiento antioxidante.

Estudios recientes indican que la regulación de la actividad de la eNOS no solo requiere de los sustratos y cofactores anteriormente mencionados, sino también de fosforilaciones y desfosforilaciones proteicas (Kolluru *et al.*, 2010). Los sitios primarios donde la eNOS es fosforilada son residuos de serina y en menor extensión residuos de tirosina (Kolluru *et*

al., 2010). Bajo condiciones de hipoxia, se ve afectada la fosforilación de la serina 1117, alterando el balance de interacción de la eNOS con la calmodulina y Ca^{+2} (Krishna *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2009). Liu *et al.* (2009) demostraron que en ovejas que gestan bajo condiciones de hipoxia, se ve afectada la vasodilatación en arteria pulmonar, por una modificación en la actividad de la eNOS, debido a una alteración en la fosforilación de la serina 1117, perturbando la interacción de la eNOS con la calmodulina, resultando finalmente en una alteración de la actividad eNOS (Liu *et al.*, 2009).

Estudios realizados en cultivos celulares describieron que las vitaminas C y E intervienen en la regulación de los niveles de NO producido por la eNOS. Por su parte la vitamina C preserva los niveles intracelulares del cofactor tetrahidrobiopterina, reduciendo el radical trihidrobiopterina. Por otra parte, la vitamina E, no presenta la misma función, siendo capaz de ejercer un efecto estimulador directo sobre la activación de la eNOS a través de la fosforilación vía serina 1117, mejorando la sensibilidad de la enzima a las diferentes concentraciones de Ca^{+2} (Heller y Werner-Felmayer, 2006). Se ha observado que la vitamina E es potenciada por el ácido ascórbico, por lo tanto, la vitamina C y E pueden actuar sinérgicamente para proveer condiciones óptimas para la formación de NO en células endoteliales, mejorando así la actividad de la eNOS (Heller y Werner-Felmayer, 2006).

La síntesis de NO, como también de poliaminas (putresina, espermidina y espermina), las cuales son otro producto del catabolismo de la arginina, son esenciales para el crecimiento y angiogénesis de la placenta, y por ello a su vez también para la transferencia de nutrientes y crecimiento del feto. Tanto el NO como las poliaminas comparten sustratos, cofactores y rutas metabólicas que permiten la síntesis de éstos (Kwon *et al.*, 2004).

Existe una interacción entre la producción de poliaminas y la actividad NOS, no del todo conocida, en donde las poliaminas tienen un efecto de inhibición sobre la actividad NOS, a través de la ruta L-arginina-NO-poliaminas (Soorana y Das, 1995). El efecto inhibitorio de las poliaminas sobre la actividad de las NOS es probablemente un mecanismo de *feed*

back regulando la producción de NO. *In vivo*, este mecanismo de *feed back* es probablemente controlado de una manera sutil y según lo expuesto por Soorana y Das (1995), como una correlación lineal entre la actividad NOS y la concentración de poliaminas, de acuerdo a las diferentes condiciones. Esto genera una interrelación importante entre las diferentes enzimas y la regulación del metabolismo de la arginina, el cual se hace bastante complejo. Por ejemplo, la producción de NO puede ser afectada por las NOS, arginasas y argininosuccinato sintetasa. Este complejo sistema puede verse afectado por cambios a nivel de la arginina, no sólo porque es un sustrato de diferentes enzimas, sino porque además la ornitina y la citrulina son claves fundamentales en el metabolismo de la arginina y, ellas a su vez, también son producidas por múltiples enzimas. En el caso de la arginasa esta compite por la disponibilidad del sustrato arginina con las NOS (Getz y Reardon, 2006). Esto es una posible explicación a la “paradoja de la arginina”. Otra posible explicación es que la arginina compite con la *asymmetrical dimethyl arginine* (ADMA), un inhibidor de la eNOS y la iNOS (Getz y Reardon, 2006). Quizás es este hecho el que pueda explicar el que se encuentre diferencia en la actividad NOS entre grupos de la porción fetal estudiada, sin encontrar diferencia en la expresión de la enzima por *western blot*. *Western blot* no detecta la enzima funcional, solo la presencia de esta y la suplementación con vitaminas puede mejorar la actividad de la enzima funcional. Además, debemos recordar que este estudio fué realizado *in vitro*, siendo condiciones diferentes a animales *in vivo*.

A su vez, la actividad NOS medida en laboratorio por el método de conversión de $^3\text{[H]}$ -Arginina a $^3\text{[H]}$ -Citrulina, requiere la adición de todos los cofactores y sustratos para el ensayo. El valor de la actividad medido en estas condiciones no necesariamente indica producción de NO *in vivo*, puesto que existe una mayor regulación en esa condición ya sea por localización, fosforilaciones, disponibilidad de sustratos y cofactores, presencia de inhibidores endógenos, etc.

En resumen, en la gestación debe existir un adecuado balance entre la producción de radicales libres y las defensas antioxidantes. En un ambiente hipobárico e hipóxico este balance se pierde favoreciendo la formación de radicales libres y provocando las

consecuencias anteriormente mencionadas. Reforzando las defensas antioxidantes propias del organismo se podría combatir los efectos dañinos del exceso de radicales libres en gestaciones de altura, disminuyendo las diferencias entre animales adaptados y no adaptados a esta condición.

Conclusiones

-El tratamiento con vitamina C+E en la dieta aumentó las concentraciones plasmáticas de dichas vitaminas.

-Se logró estandarizar la técnica de detección de la isoenzima eNOS (tiempo de transferencia, cantidad de proteína, dilución de anticuerpo). Detectándose tanto en placenta materna como fetal.

-Se determinó la actividad NOS dependiente de Ca^{+2} y calmodulina en todos los grupos y estructuras analizadas, sin detectarse actividad independiente de Ca^{+2} atribuible a la iNOS, lo que concuerda con el resultado negativo para iNOS mediante *western blot*.

-La suplementación diaria de vitaminas antioxidantes C y E ayuda a prevenir los efectos producidos en la placenta y en el feto debido a la presencia de estrés oxidativo en animales que gestan en altura, pudiendo lograr de esta forma un desarrollo gestacional equivalente al observado en animales que gestana nivel del mar.

-La terapia con vitaminas C y E puede utilizarse como una importante herramienta para lograr una mayor eficiencia en la producción ovina de altura, logrando aumentar efectivamente los pesos fetales.

BIBLIOGRAFIA

- **Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG.** 2003. Nitric Oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*; **357**: 593-615.

- **Alegría D.** Efectos de la terapia antioxidante sobre la expresión y localización placentaria de VEGF, NOS y Leptina en ovejas que cursan su gestación en hipoxia hipobárica. Memoria para optar al título de Médico Veterinario. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. 2010. 21p.

- **Al-Hijji J, Andolf E, Laurini R, Batra S.** 2003. Nitric oxide synthase activity in human trophoblast, term placenta and pregnant myometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*; **1**: 51.

- **Ali M, Buhimschi I, Chwalisz K, Garfield RE.** 1997. Changes in expression of the nitric oxide synthase isoforms in rat uterus and cervix during pregnancy and parturition. *Molecular Human Reproduction*; **3**: 995-1003.

- **Askew EW.** 2002. Work at high altitude and oxidative stress: antioxidant nutrients. *Toxicology*; **180**: 107-119.

- **Ash D.** 2004. Structure and function of Arginases. *The Journal of Nutrition*; **134**: 2760s-2764s.

- **Ballew C, Haas JD.** 1986. Hematologic evidence of fetal hypoxia among newborn infants at high altitude in Bolivia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*; **155**: 166-169.

- **Beall CM, Soung K, Elston RC, Goldstein MC.** 2004. Higher offspring survival among Tibetan women with high oxygen saturation genotypes residing at 4,000 m. *Proceedings of the National Academy of Sciences* ; **101** (39): 14300-14304.

- **Behn C, Araneda OF, Llanos AJ, Celedón G, González G.** 2007. Hypoxia related lipid peroxidation: Evidences, implications and approaches. *Respiratory Physiology & Neurobiology*; **158**: 143-150.

- **Black WD, Hidioglou M.** 1996. Pharmacokinetic study of ascorbic acid in sheep. Canadian Journal of Veterinary Research; **60**:216-221.

- **Bordoni A, Angeloni C, Leoncini E, Danesi F, Maranesi M, Biagi PL, Rehíla S.** 2005. Hypoxia/reoxygenation alters essential fatty acids metabolism in cultured rat cardiomyocytes: protection by antioxidants. Nutrition Metabolic Cardiovascular Disease; **15**: 166-173.

- **Bredt D, Snyder SH.** 1990. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. Proceedings of the National Academy of Sciences; 87 (2):682-685.

- **Brune B, Zhou J.** 2007. Nitric oxide and Superoxide: Interference with hypoxic signaling. Cardiovascular Research; **75**: 275-282.

- **Capper JL, Wilkinson RG, Kasapidou E, Pattinson SE, Mackenzie AM, Sinclair LA.** 2005. The effect of dietary vitamin E and fatty acid supplementation of pregnant and lactating ewes on placental and mammary transfer of vitamin E to the lamb. British Journal Nutrition; **93**: 549-557.

- **Cattan P.** 1993. Fauna de Vertebrados del Altiplano: un análisis comparativo en el extremo norte de Chile. In: El altiplano: ciencia y conciencia en los Andes: actas del II Simposio Internacional de Estudios Altiplánicos. Arica. Chile. Octubre 19 al 21. U. De Chile **Pp**: 203.

- **Cormanc T, Pouyssegur J.** 2007. Stress Responses In Biology and Medicine Stress of Life in Molecules, Cells, Organisms, and Psychosocial Communities. **In** Annals of the New York Academy of Sciences. New York. USA. **1113**: 87-94.

- **Chappell LC, Seed PT, Kelly FJ, Briley A, Hunt BJ, Charnock-Jones S, Mallet A, Poston L.** 2002. Vitamin C and E supplementation in women at risk of preeclampsia is associated with changes in indices of oxidative stress and placental function. American Journal of Obstetrics & Gynecology; **187**:777-84.

- **Cho MM, Ziats NP, Pal D, Utian WH, Gorodeski GI.** 1999. Estrogen modulates paracellular permeability of human endothelial cells by eNOS and iNOS-related Mechanisms. American Journal Physiology; **276**:C337-349.

- **De Carolis G.** 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. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad de Chile pp 261.

- **Dosek A, Ohno H, Acts Z, Taylor AW, Radack Z.** 2007. High altitude and oxidative stress. *Respiratory Physiology & Neurobiology*; **158**: 128–131.

- **Fagan KA, Morrisey B, Fouty BW, Sato K, Wrigth J, Morris Jr KG, Hoedt- Miller M, Vidmar S, McMurtry I.** 2001. Uregulation of nitric oxide synthase in mice with severe hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respiratory Research*; **2**: 306-313.

- **Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H.** 1998. Expressional control of the “constitutive” isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *The journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*; **12**: 773-790.

- **Galleguillos MA, Valenzuela MA, Riquelme R, Sanhueza E, Sanchez G, Figueroa JP, Llanos AJ.** 2001. Nitric oxide synthase in brain tissues from llama fetuses submitted to hypoxemia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*; **129**: 605-614.

- **Getz GS, Reardon C.** 2006. Arginine/Arginase NO NO NO. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*; **26**:237-239

- **Gigante B, Morlino G, Gentile MA, Persico MG, De Falco S.** 2005. PIGF, eNOS, mice show defective angiogenesis associated with increased oxidative stress in response to tissue ischemia. *The journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*; **20**: 70-79.

- **Giuliano D, Ceriello A, Paolisso G.**1996. Oxidative Stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*; **19**(3): 257-67.

- **Gonzales G.** 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* 1010-1016.

- **Heller R, Werner-Felmayer G.** 2006. Antioxidants and endothelial nitric oxide synthesis. *Journal Clinic Pharmacology*; **62**: 21-28.

- **Hidiroglou M.** 1999. Technical note: forms and route of vitamin C supplementation for cows. *Journal of Dairy Science*; **82**: 1831-1833.

- **Huerta M, Ortega ME, Lobos M, Herrera JG, Díaz A, Guinzberg R.** 2005. Estrés Oxidativo y uso de antioxidantes en animales domésticos. *Interciencia*; **30** (012): 728-734.

- **Ilavazhagan G, Bansal A, Prasad D, Thomas P, Sharma SK, Kain AK, Kumar D, Selvamurthy W.** 2001. Effect of vitamin E supplementation on hypoxia-induced oxidative damage in male albino rats. *Aviaton, Space and Environmental Medicine*; **72**: 899-903.

- **Ishikawa T, Harada T, Koi H, Kubota T, Azuma H, Aso T.** 2006. Identification of Arginase in Human Placental Villi. *Placenta*; **28**: 133-138.

- **Jacobs R, Robinson JS, Owens JA, Falconer J, Webster ME.** 1988. The effect of prolonged hypobaric hypoxia on growth of fetal sheep. *Journal of Developmental Physiology*; **10** (2): 97-112.

- **Keyes LE, Armaza F, Niermeyer S, Vargas E, Young DA, Moore LG.** 2003. Intrauterine growth restriction, preeclampsia, and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. *Pediatric Research*; **54**: 20-25.

- **Kolluru GK, Siamwala JH, Chatterjee S.** 2010. eNOS phosphorylation in health and disease. *Biochimie*; **92**:1186-1198.

- **Kone BC, Kunczewicz T, Zhang W, Yu Z.** 2003. Protein interactions with nitric oxide synthase controlling the right time, the right place, and the right amount of nitric oxide. *American Journal Physiology-Renal Physiology*; **285**:F178-190.

- **Krampfl E.** 2002. Pregnancy at high altitude. *Ultrasound in Obstetric & Gynecology*; **19**: 535-539.

- **Kwon H, Wu G, Meininger CJ, Bazer FW, Spencer TE.** 2004. Developmental Changes in Nitric Oxide Synthesis in Ovine Placenta. *Biology of Reproduction*; **70**: 679-686.

- **Laemmli U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*; **227**: 680-685.

- **Landvik ShV, Diplock AT, Packer L.** 2002. Efficacy of vitamin E in human health and disease. Cap 4. In: *Handbook of antioxidants*. 2º Ed. Cardenas E., Packer L. (Eds), Marcel Dekker, Inc. N.Y. U.S.A. s/p.

- **Lanino I.** 1977. Antecedentes de las explotaciones ganaderas de Isluga. Altiplano de la provincia de Iquique. Universidad del Norte, Iquique. Centro Isluga de Investigaciones Andinas 148p.

- **Lee BE, Hong YC, Lee K-WW, Kim YJ, KIM WK, Chang NS, Park EA, Park HS, Hann HJ.** 2004. Influence of maternal serum levels of vitamins C and E during the second trimester on birth weight and length. *European Journal of Clinical Nutrition*; **58**:1365-71.

- **Liu J, Gao Y, Negash S, Longo L, Raj J.** 2009. Long-term effects of prenatal hypoxia on endothelium-dependent relaxation responses in pulmonary arteries of adult sheep. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*; **296**(3):L547-L554.

- **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr All, Randall LJ.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biology Chemistry*; **193**:265-275.

- **National Research Council.** 1985. "Nutrient Requeriments of Sheep". 6th Ed. National Academy Press. Washintgon, DC.

- **Moore LG.** 2003. Fetal growth restriction and maternal oxygen transport during high altitude pregnancy. *High Altitude Medical Biology*; **4**:141-156.

- **Myatt L, Brewer A, Brockman DE.** 1991. The action of nitric oxide in the perfused human fetal-placental circulation. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*; **164**:687-692

- **Onoda M y Inano IL.** 1998. Localization of nitric oxide synthases and nitric oxide production in the rat mammary gland. *Journal Histochemics Cytochemical*; **46**: 1269-1278.

- **Pachla LA, Kissinger PT.** 1979. Analysis of ascorbic acid by liquid chromatography with amperometric detection. *Methods in Enzymology*; **62**: 15-24.

- **Padayatty SJ, Daruwala R, Wang Y, Eck PK, Song Koh WS, Levine M.** 2002. Vitamin C: from molecular actions to optimum intake, Cap 7 **In: Handbook of antioxidant.** 2º Ed. Cardenas E.; Packer L. (Eds), Marcel Dekker, Inc. N.Y. U.S.A, s/p.

- **Parraguez VH, Atlaglich M, Diaz R, Bruzzone ME, Behn C, Raggi LA.** 2004. Lambs growth at high altitude: comparison between animals with different time of adaptation to hypoxic environment. *Agro-Ciencia*; **20**:39-45.

- **Parraguez VH, Atlaglich M, Díaz R, Cepeda R, Gonzales C, De los Reyes M, Bruzzone ME, Behn C, Raggi LA.** 2006. Ovine placenta at high altitudes: Comparison of animal with different times of adaptation to hypoxic environment. *Animal Reproduction Science*; **95**:151-157.

- **Parraguez VH, Atlaglich M, Araneda O, García C, Muñoz A, De los Reyes M, Urquieta B.** 2011. Effect of antioxidant vitamins on newborn and placental traits in gestations at high altitude: comparative study in high-and low-altitude native sheep. *Reproduction, Fertility & Development*; **23**(2):285-296

- **Park HS, Kim SR, Lee YC.** 2009. Impact of oxidative stress on lung diseases. *Respirology*; **14**: 27-38.

- **Penninga L, Longo LD.** 1998. Ovine placentoma morphology: effect of high altitude, long-term hypoxia. *Placenta*; **19**: 187-193.

- **Raijmakers MTM, Dechend R, Poston L.** 2004. Oxidative stress and preeclampsia. *Hypertension*; **44**: 374-380.

- **Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KM, Johnson M, Grazul-Bilska AT, Redmer DA, Caton JS.** 2005. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *The Physiological Society*; **565**: 43-58.

- **Reynolds LP, Redmer DA.** 1995. Utero-placental vascular development and placental function and inhibition. *Journal Animal Science*; **73**: 1839-1851.

- **Schmidt MC, Askew EW, Roberts DE, Prior RL, Ensign Jr., WY, Hesslink Jr., RE.** 2002. Oxidative stress in humans training in a cold, moderate altitude environment and their response to a phytochemical antioxidant supplement. *Wilderness & Environmental Medicine*; **13**: 94–105.

- **Sheppard C, Shaw CE, Li Y, Bird IM, Magness RR.** 2001. Endothelium-Derived Nitric Oxide Synthase Protein Expression in Ovine Placental Arteries. *Biology of Reproduction*; **64**: 1494-1499.

- **Sooranna S, Das I.** 1995. The inter-relationship between polyamines and the L-arginine nitric oxide pathway in the human placenta. *Biochemical and Biophysical research communication*; 229-234.

- **Taylor CT, Pouyssegur J.** 2007. Oxygen, Hypoxia and stress. *New York Academy of Sciences*; **1113**: 87-94.

- **Tuder RM, Yun JH, Bhunia A, Fijalkowska I.** 2007. Hypoxia and chronic lung disease. *Journal of Molecular Medicine*; **85**: 1317-1324.

- **Uzun Ö, Balbay Ö, Çomunoglu NÜ, Yavuz Ö, Annakkaya AN, Güler S, Silan C, Erbas M, Arbak P.** 2006. Hypobaric-Hypoxia-induced pulmonary damage in rats ameliorated by antioxidant erdosteine. *Acta Histochemica*; **108**: 59-68.

- **Vagnoni KE, Magness RR.** 1999. Estrogen and lipopolisacharide stimulation of prostacyclin production and the levels of cyclooxygenase and nitric oxide shynthase in ovine uterine arteries. *Biology of Reproduction*; **59**: 1008-1015.

- **Vagnoni KE, Shaw CE, Phernetton TM, Meglin BM, Hird LM, Magness RR.** 1999. Endothelial Vasodilator production by uterine and systemic Arteries HL. Ovarian and estrogen effectcs on NO synthase. *American Journal Physiology*; **275**: 111845-1856.

- **Vij AG, Dutta R, Stija NK.** 2005. Acclimatization to oxidative stress at high altitude. *Estados Unidos. High Altitude Medical Biology*; **6**:301-310.

- **Vonnahme KA, Wilson ME, Li Y, Rupnow HL, Phernetton TM, Ford SP, Magness RR.** 2005. Circulating levels of nitric oxide and vascular endothelial growth factor throughout ovine pregnancy. *The journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*; **565.1**: 101-109.

- **Wang, Walsh SW.** 2001. Increased superoxide generation is associated with decreased superoxide dismutase activity and mRNA expression in placental trophoblast cells in pre-eclampsia. *Placenta*; **22(2-3)**:206-12.

- **West JB.** 2002. El sistema respiratorio en condiciones de estrés. Cap 9. *In Fisiología respiratoria*. 6° Ed. J.B West. Buenos Aires, Argentina **Pp** 131-14

- **Wood ChE, Chen G, Keller-Wood.** 2005. Expression of nitric oxide synthase isoforms is reduced in late-gestation ovine fetal brainstem. *American Journal Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*; **289**:R613-R619.

- **Wisdom SJ, Wilson R, McKillop JH, Walker JJ.** 1991. Antioxidant system in normal pregnancy and in pregnancy-induced hypertension. *American Journal Obstetrics & Gynecology*; **165** (6 Pt 1): 1701-4.

- **Zarlingo TJ, Eis AL, Brockman DE, Kossenjans W, Myatt L.** 1997. Comparative localization of endothelial and inducible nitric oxide synthase isoforms in haemochorial and epitheliochorial placentae. *Placenta*; **18(7)**:511-20

- **Zhang H, Du Y, Cohen RA, Chovanian AV, Brecher P.** 1999. Adventitia as a source of inducible nitric oxide synthase in rat aorta. *American Journal Hypertension*; **12**: 467-475.

- **Zhao B, Tham SY, Lu J, Lai MH, Lee LK, Moochhala SM.** 2004. Simultaneous determination of vitamins C, E and beta-carotene in human plasma by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*; **7(2)**:200-4.

- **Zheng J, Magness RR, Bird IM.** 1998. A cell model for studying expression of fetal-placental artery endothelial cell angiotensin 11 type-1 receptors and nitric oxide synthase. *Medical Biochemistry*; **1**:57-64.

- **Zheng J, Bird IM, Melsaether AM, Magness RR.** 1999. Activation of the mitogen-activated protein kinase cascade is necessary but not sufficient for basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor stimulated expression of endothelial nitric oxide synthase. *Endocrinology*; **140**:1399-1407.

- **Zheng J, Li Y, Weiss AR, Bird IM, Magness RR.** 2000. Expression of Endothelial and Inducible Nitric Oxide Synthases and Nitric Oxide Production in Ovine Placental and Uterine Tissues During Late pregnancy. *Placenta*; **21**:516-524.