

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**ROL ANTIOXIDANTE DE MELATONINA EN EL
DESBALANCE OXIDATIVO PRESENTE EN LA
HIPERTENSIÓN PULMONAR DEL NEONATO DE OVEJA
CRÓNICAMENTE HIPÓXICO**

FLAVIO SEBASTIÁN TORRES GONZÁLEZ

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS MÉDICAS Y
CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN FISIOPATOLOGÍA**

Director de Tesis: Dr. Emilio Herrera V.

2014

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

FLAVIO SEBASTIAN TORRES GONZALEZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Médicas y Biológicas con mención en Fisiopatología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 28 de marzo de 2014

**Prof. Dr. Emilio Herrera V.
Director de Tesis
Programa de Fisiopatología, ICBM
Facultad de Medicina, Universidad de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Emilia Sanhueza

Prof. Dr. Aníbal Llanos

Prof. Dra. Paola Casanello

**Prof. Dr. Rubén Torres
Presidente Comisión**

DEDICATORIA

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”.

Isaac Newton

A mis padres Flavio y María Teresa
por su incondicional apoyo y cariño.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de forma muy especial a mi tutor Dr. Emilio Herrera que gracias a sus cualidades como docente, científico y persona lograron que pudiese terminar la tesis de la mejor forma posible.

Agradezco a las personas que integran el laboratorio donde trabajé, en especial al Dr. Llanos, por el conocimiento y sabiduría entregados, al Dr. Reyes por su experiencia y buena voluntad, a la Dra. Serón-Ferré por su motivación y apoyo.

A Camilo quien me ayudó a desarrollar la parte técnica en la realización de mis experimentos, al igual que Alejandro.

A mis compañeros de laboratorio que de una u otra forma con su apoyo y experiencia lograron que mi trabajo fuese más fácil, Germán, Ismael, Marcelino y Teresa.

A las personas que desinteresadamente pudieron facilitarme sus instalaciones para realizar experimentos, Dra. Casanello, Dr. Ramón Rodrigo.

A mi familia que pudo soportar mi ausencia y me entendieron, Papas, Paola, Marcela y sobrinas.

Y a ti Coni por el cariño, la comprensión, la paciencia, el apoyo y motivación que incondicionalmente me has brindado todo este tiempo.

Gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
ABREVIATURAS	4
INTRODUCCIÓN	5
Hipoxia crónica de altura e hipertensión pulmonar.....	5
Hipertensión pulmonar en el neonato	7
Estrés oxidativo.....	10
Estrategias antioxidantes: Melatonina	20
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
METODOLOGÍA	25
Modelo experimental.....	25
Determinaciones	27
Expresión génica pulmonar	27
Expresión proteica pulmonar	29
Actividad enzimática pulmonar	31
Marcadores de estrés oxidativo	33
Análisis estadístico.....	35
RESULTADOS	36
Enzimas antioxidantes	36
Biomarcadores de estrés oxidativo.....	42
Resultados anexos.....	44
DISCUSIÓN.....	47
BIBLIOGRAFÍA.....	54
ANEXO – Impacto científico de la Tesis	67

RESUMEN

Más de 140 millones de personas residen en un ambiente hipóxico por sobre los 2500 m de altura, susceptibles a desarrollar alteraciones cardiovasculares. Este ambiente es más riesgoso cuando afecta la adecuada transición feto-neonato en la etapa perinatal, siendo capaz de generar hipertensión pulmonar del recién nacido. El estrés oxidativo, es uno de los mecanismos a través del cual la hipoxia genera daño vascular. Por otro lado, melatonina es una neurohormona con importantes propiedades antioxidantes. Como la hipertensión pulmonar neonatal actualmente carece de tratamiento definitivo, esta tesis propone utilizar melatonina, como tratamiento emergente para reducir el estrés oxidativo pulmonar generado por la hipoxia crónica en neonatos gestados y nacidos en altura.

Como modelo experimental se utilizaron recién nacidos de oveja gestados y nacidos a 3.600 m, constituyendo 2 grupos, uno control (vehículo $0,5 \text{ ml.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ v.o., CN, n=6) y un grupo tratado con melatonina ($1 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{d}^{-1}$ v.o., MN, n=6), recibiendo tratamiento por 8 días. Al final del tratamiento (12 días de edad) los neonatos se eutanizaron para obtener muestras de tejido pulmonar y realizar medición de actividad de enzimas antioxidantes, marcadores de estrés oxidativo y el factor de transcripción Nrf2.

Los resultados muestran que melatonina logró aumentar el mRNA de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa 2 (SOD2), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa 3 (GPx3) e incrementó la actividad de CAT. Además, los animales tratados con melatonina mostraron menores niveles de productos de lipoperoxidación, con disminución de los de 8-isoprostanos y menor expresión de 4-HNE.

Los resultados de esta tesis confirman la capacidad antioxidante de melatonina, atribuyéndole aún más un rol como emergente antioxidante y potencialmente útil coadyuvante en el tratamiento de la hipertensión pulmonar neonatal.

ABSTRACT

More than 140 million people inhabit in hypoxic environments over 2500 m of altitude, susceptible to develop cardiovascular disorders. This condition involves a higher risk when affecting the normal fetal – neonatal transition in the perinatal period, inducing pulmonary hypertension of the newborn. Oxidative stress is one of the hypoxic-induced mechanisms that cause vascular damage. Conversely, melatonin is a neurohormone with important antioxidant properties. As neonatal pulmonary hypertension currently has no definitive treatment, this thesis put forward the therapeutic use of melatonin as an emerging treatment for reducing pulmonary oxidative stress caused by chronic hypoxia in neonates gestated and born at high altitude.

As experimental model we used newborn sheep gestated and born at 3,600 m. Two groups were constituted, one control (vehicle 0,5 ml.kg⁻¹.d⁻¹ orally, CN, n=6) another treated with melatonin (1 mg.kg⁻¹.d⁻¹ orally, MN, n=6), both treated for 8 days. At the end of treatment (12 days old), the neonates were euthanized obtaining lung tissue samples to perform antioxidant enzymes analysis, oxidative stress biomarkers and expression of the transcription factor Nrf2.

The results show that melatonin increases the mRNA for the antioxidant enzymes superoxide dismutase 2 (SOD2), catalase (CAT) and glutathione peroxidase 3 (GPx3) and enhances CAT activity. Also, melatonin treated animals show decreased levels of lipoperoxidation products, with decreased 8-isoprostanes and 4-HNE.

These thesis outcomes, support melatonin antioxidant capacity and establish melatonin as an emerging antioxidant potentially useful as coadyuvant in treating neonatal pulmonary hypertension.

ABREVIATURAS

pO₂ : Presión parcial de oxígeno	TNF-α : Factor de necrosis tumoral α
HAP : Hipertensión arterial pulmonar	IFN-γ : Interferón gamma
PAPm : Presión de arteria pulmonar media	AP-1 : Proteína activadora 1
RVP : Resistencia vascular pulmonar	AP-2 : Proteína activadora 2
GC : Gasto cardíaco	PPARγ : Receptor activador de la proliferación de peroxisomas-γ
VPH : Vasoconstricción pulmonar hipóxica	NADH : Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
ROS : Especies reactivas de oxígeno	NADPH : Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducida
RNS : Especies reactivas de nitrógeno	TBARS : Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
ROCK : Rho quinasa	FRAP : Capacidad reductora del hierro del plasma
INCAS : Centro internacional de estudios andinos	NQO1 : NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1
•O₂⁻ : Anión superóxido	HO-1 : Hemo oxigenasa - 1
H₂O₂ : Peróxido de hidrógeno	DHBS : 2,5 - dihidroxi – bencenosulfonato
OH• : Radical hidroxilo	AAP : Peróxido de acetyl acetona
ONOO⁻ : Peroxinitrito	HRP : Peroxidasa del rábano
SOD : Superóxido dismutasa	BSA : Albumina sérica bovina
CAT : Catalasa	AChE : Acetilcolinesterasa
GPx : Glutati6n peroxidasa	TMP : 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano
GR : Glutati6n reductasa	ESM : Error estándar de la media
GSH : Glutati6n reducido	cAMP : Adenosín monofosfato cíclico
GSSG : Glutati6n oxidado	NFκB : Factor nuclear κB
L• : Radical lipídico	FDA : Agencia de Drogas y Alimentos
LOO• : Radical lipoperoxido	DNA : Ácido desoxirribonucleico
LOOH : Hidroperóxido	mRNA : Ácido ribonucleico
MDA : Malondialdehído	PCR : Reacci6n en cadena de la polimerasa
4-HNE : 4-hidroxinonenal	RT-PCR : Reacci6n en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa
4-HHE : 4-hidroxil-2-hexenal	dNTPs : Desoxinucleótidos trifosfatados
XO : Xantino oxidasa	EDTA : Ácido etilendiaminotetraaceticico
XD : Xantino deshidrogenasa	WB : Western blot
Nrf2 : Factor relacionados al factor nuclear eritroide-2	HIF-1 : Factor inducible por hipoxia-1
ARE : Elementos de Respuesta Antioxidante	
NO : Óxido nítrico	
NOx : Óxidos mono nıtrogeno	
eNOS : Óxido nítrico sintasa endotelial	
iNOS : Óxido nítrico sintasa inducible	

INTRODUCCIÓN

Hipoxia crónica de altura e hipertensión pulmonar

La composición de nuestra atmósfera terrestre es relativamente constante, con aproximadamente 78% nitrógeno, 21% oxígeno, 1-2% de otros gases y vapor de agua. Sin embargo, la disponibilidad de estos gases se ve influenciada por la presión barométrica, la cual disminuye con la altitud. De hecho, la concentración de oxígeno se mantiene relativamente constante con la altura, pero su menor presión parcial es determinante para el desarrollo de vida en estas condiciones. Es así como, conforme aumenta la altura geográfica disminuye la presión parcial de los gases atmosféricos y por lo tanto la de oxígeno, fenómeno conocido como hipoxia de altura o hipoxia hipobárica. Actualmente más de 140 millones de personas residen de forma permanente por sobre los 2500 m de altura geográfica expuestas a un ambiente de hipoxia hipobárica desarrollando en consecuencia hipoxia alveolar, hipoxemia y policitemia [1]. Considerando además unos 40 millones de visitantes/año a áreas de altura, la población expuesta a hipoxia hipobárica por año se acerca a los 200 millones de habitantes, hecho que proyecta los efectos de la altura en el sistema cardiovascular como un problema de salud pública a nivel mundial [2] y sobre todo en nuestra región andina que es donde existe la mayor densidad de población sobre los 3500 m [3]. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de residentes en altura, la mayoría desempeña actividades de forma similar a personas a nivel del mar debido a que ocurren mecanismos adaptativos en diferentes etapas del sistema transportador de oxígeno que llevan a una disminución en el gradiente de tensión de oxígeno (pO_2) total desde el aire ambiental hipóxico a la sangre venosa mixta a nivel tisular [4, 5].

Personas aparentemente sanas en grandes altitudes tienden a desarrollar hipertensión arterial pulmonar (HAP), hipertrofia ventricular derecha y mayor cantidad de células musculares lisas en arterias pulmonares pequeñas [6]. Según el último Simposio mundial en hipertensión pulmonar, realizado en Niza (2013), la hipertensión

pulmonar está definida como una presión de arteria pulmonar media (PAPm) de >25 mmHg en reposo o >30 mmHg con ejercicio [7]. Además, existe una población en riesgo de desarrollar hipertensión pulmonar que son los individuos que presenten una PAPm entre 20-24 mmHg. La prevalencia de HAP en altura no es clara, pero datos obtenidos de habitantes que residen por sobre los 3500 m en el altiplano andino la sitúan entre un 5-18% [2]. De hecho, estudios a diferentes altitudes en Los Andes y Asia permiten establecer una relación inversa entre la altitud y la PAPm [8-13], por ejemplo a 4540 m de altura, la presión de arteria pulmonar media (PAPm) es de alrededor de 28 mmHg en contraste a los 10-14 mmHg de personas adultas que viven a nivel de mar [8].

Los principales factores involucrados en el aumento de la PAP en altura son la aumentada vasoconstricción pulmonar y el remodelamiento vascular pulmonar que determinan un menor lumen vascular y mayor resistencia vascular pulmonar (RVP) [14]. La aumentada vasoconstricción pulmonar en altura, responde a un fenómeno conocido como *vasoconstricción pulmonar hipóxica* (VPH) por el cual moléculas “sensores de oxígeno”, ubicadas en la vasculatura pulmonar, detectan la caída en la pO₂ en sangre arterial y llevan a vasoconstricción de arteriolas y arterias pulmonares. Adicionalmente, la vasoconstricción del territorio de pequeñas venas otorga alrededor de un ~20% a la resistencia vascular pulmonar total por hipoxia [15, 16]. El objetivo fisiológico de la VPH es adecuar la ventilación con perfusión para reducir la hipoxemia arterial evitando que el flujo sanguíneo pase por áreas poco ventiladas (oxigenadas) [17], lo cual es extraordinariamente funcional y adaptativo para episodios de hipoxia aguda. Sin embargo, en procesos que involucran la persistencia de esta respuesta, como en la altura, se instaura una respuesta a hipoxia crónica. Uno de los efectos más importantes de la hipoxia crónica es el remodelamiento vascular pulmonar, principalmente dependiente de la capa media, donde existe hipertrofia o hiperplasia de las células musculares lisas de arteria pulmonar [18]. Los mecanismos que explican la patogénesis de la HAP hipóxica propuestos son alteraciones en la regulación de canales iónicos de membrana y sensores de O₂, cambios en el estado redox, producción de especies reactivas de

oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), e inhibición de la fosforilación oxidativa, entre otros [19-21].

En definitiva, el remodelamiento vascular pulmonar en la HAP de altura es una respuesta fisiopatológica (*maladaptativa*) a largo plazo frente a una baja pO_2 atmosférica. Sin embargo, existen excepciones en poblaciones humanas y animales que han sido expuestas por varias generaciones a una presión selectiva ambiental, y por lo tanto tienen modificaciones cardiopulmonares que permiten una mejor adaptación a la altitud. Por ejemplo, poblaciones Tibetanas de los Himalaya tienen arterias pulmonares pequeñas sin hipertrofia de su capa muscular [22]. A la vez, animales de grandes altitudes también muestran respuestas adaptativas, como el yak o la llama, que tienen una capa muscular de arterias pulmonares delgadas, y no presentan HAP [18, 23, 24]. Los mecanismos que median las respuestas adaptativas y compensatorias a la hipoxia crónica de altura aún no están del todo claros, son complejos e implican modificaciones estructurales y funcionales de la vasculatura pulmonar.

Hipertensión pulmonar en el neonato

La adecuada transición fetal – neonatal que ocurre con el nacimiento es crucial para el normal desarrollo de la vida postnatal. La circulación pulmonar sufre cambios notables en este periodo la cual pasa de un estado de alta resistencia/bajo flujo sanguíneo vascular en el feto (8 – 10% del gasto cardíaco combinado), a un estado de baja resistencia/alto flujo sanguíneo (100% del gasto cardíaco), para lograr en pocos minutos un pulmón funcional al nacer [25]. La aumentada resistencia vascular pulmonar en el último trimestre de la gestación impide que gran parte del gasto cardíaco del ventrículo derecho se dirija hacia el pulmón, permitiendo que este flujo sanguíneo pase a través del foramen oval y del ducto arterioso para que llegue a la placenta, órgano responsable del intercambio gaseoso y oxigenación de la sangre en la vida fetal [26]. El estado de vasoconstricción pulmonar prenatal está comandado por diversos factores como el aumento del músculo liso vascular, la

presión del fluido pulmonar en espacios aéreos, la interrelación entre sustancias vasoactivas favoreciendo la vasoconstricción y por la disminuida tensión de O₂ arterial, cuyo valor en arteria pulmonar es de 12 – 19 mmHg y una saturación del 50% [27]. Con el nacimiento y la mayor llegada de oxígeno al pulmón, se revierte la vasoconstricción hipóxica y la circulación pulmonar se dilata, se adelgazan las paredes de arterias pulmonares y disminuye la resistencia vascular pulmonar. Esto permite al pulmón recibir la totalidad del gasto cardíaco, reemplazando a la placenta como órgano de intercambio gaseoso [26]. Si por alguna razón un factor estresante altera el normal descenso de la resistencia vascular pulmonar al nacer, las características de la circulación pulmonar fetal persistirán en la vida postnatal, generando la entidad patológica conocida como hipertensión pulmonar neonatal.

De todos los factores estresantes a los cuales puede estar sometido el feto, tal vez el más importante es la hipoxia. El feto puede experimentar hipoxia crónica bajo muchas condiciones, incluyendo las gestaciones que ocurren en grandes altitudes (>2500m). De hecho, la hipoxia crónica intrauterina es uno de los factores más importantes asociados con hipertensión pulmonar persistente del recién nacido [28]. No existen mediciones directas de PAPm en recién nacidos de altura y tierras bajas al momento de nacer, pero según estimaciones se presumen similares (~60 mmHg); sin embargo en los recién nacidos a nivel de mar ocurre una rápida declinación de la PAPm, mientras que en recién nacidos de altura el descenso es más lento y no alcanza los valores normales manteniéndose altos en la vida adulta [6]. Se ha reportado que niños nacidos en altitudes de 3500 a 4500 m muestran valores de PAPm de ~40 mm de Hg durante la infancia [29]. Además, el patrón histológico de arterias pulmonares pequeñas de recién nacidos a nivel del mar y en altura es similar, con aumento de la capa muscular (patrón fetal). En contraste, las arterias pequeñas de recién nacidos a nivel de mar experimentan un remodelamiento fisiológico postnatal, que consiste en una rápida regresión de la cantidad de músculo liso con adelgazamiento de la pared y un aumento del lumen. Lo anterior se contrasta con las arterias pulmonares pequeñas de recién nacidos en altura, donde

el patrón fetal varía muy poco, persistiendo el aumento de la capa muscular en la vida adulta [30].

Aún no existen datos confiables acerca de la prevalencia de hipertensión pulmonar neonatal en altura, sin embargo estudios hechos en Bolivia, demuestran que tanto la mortalidad materna como la neonatal aumentan conforme se incrementa la altitud. Dentro de las patologías perinatales que ven aumentada su prevalencia en altura, están la restricción del crecimiento intrauterino, pre-eclampsia y síndrome de distrés respiratorio del recién nacido [31]. A nivel de mar la prevalencia de hipertensión pulmonar es de 2/1000 recién nacidos y está asociado a una elevada morbi-mortalidad neonatal [32], donde la hipoxia crónica es una de las causas más importantes [33]. Si bien los mecanismos que generan hipertensión pulmonar tanto a nivel de mar como en altura pueden ser diferentes, sus efectos finales en la circulación pulmonar son comunes. Estos cambios comunes corresponden a un remodelamiento vascular patológico con muscularización de arterias periféricas, aumento de la matriz extracelular y mayor vasocontractilidad determinada por un desbalance de agentes vasoactivos, con predominancia de vasoconstrictores (endotelina, especies reactivas de oxígeno, y ROCK, entre otros) [34-36]. En la actualidad, el abordaje terapéutico en los recién nacidos que manifiestan esta patología es un real desafío, debido a la complejidad de los mecanismos involucrados en el desarrollo de hipertensión pulmonar. Las terapias actuales como la oxigenoterapia [37], el NO inhalado [38] o el sildenafil [39] no han logrado reducir la tasa de morbi-mortalidad de la hipertensión pulmonar, la que sigue siendo del 5-10 % [37].

Teniendo en cuenta que la hipertensión pulmonar es un problema de salud pública a nivel mundial, cuyo tratamiento aún es ineficaz, se hace evidente la necesidad de un conocimiento más acabado para un abordaje más completo. En respuesta a esta necesidad, la Universidad de Chile estableció un centro de investigación de hipoxia de altura, el Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS), ubicado en Putre, a 3600 m de altitud. Es aquí donde se desarrolló un modelo perinatal de estudio de los efectos de la hipoxia crónica en la circulación

pulmonar con neonatos de oveja gestados y nacidos a 3600 m. Este modelo animal ha podido ser bien caracterizado y ha demostrado reproducir fielmente los cambios morfológicos y funcionales comunes que se presentan en la hipertensión pulmonar [24, 40-45]. Es así como estos neonatos de oveja gestados en altura presentan valores de presión arterial pulmonar y gasto cardíaco elevado (20-25 mmHg y 330-350 ml·min⁻¹·kg⁻¹, respectivamente) en comparación a los neonatos gestado a nivel de mar (~13mmHg y ~280 ml·min⁻¹·kg⁻¹, respectivamente), además de una marcada hiperreactividad vascular, disfunción vascular de pequeñas arterias y remodelamiento de la pared vascular pulmonar [40-42]. La utilización de este modelo en el presente trabajo permitirá profundizar en uno de los principales mecanismos que podría estar involucrado en el desarrollo de la hipertensión pulmonar, el estrés oxidativo.

Estrés oxidativo

El oxígeno molecular (dioxígeno, O₂) es esencial para la supervivencia de organismos aeróbicos. La energía metabólica aeróbica es dependiente de la fosforilación oxidativa mitocondrial, proceso por el cual la energía óxido reductora de la cadena transportadora de electrones es convertida en ATP. El O₂ sirve como aceptor final de electrones para la citocromo-c oxidasa que cataliza la reducción del O₂ a H₂O. Durante este y otros procesos de transferencia de electrones se producen metabolitos parcialmente reducidos y altamente reactivos del O₂. Estos metabolitos corresponden al anión superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), formados a partir de la reducción de 1 y 2 electrones respectivamente. En presencia de iones metálicos de transición (Fe²⁺, Cu⁺) se puede llegar a formar el radical hidroxilo (OH \bullet) que es aún más reactivo. Estos metabolitos parcialmente reducidos del O₂ son conocidos como “especies reactivas de oxígeno” (ROS) [46]. ROS han sido tradicionalmente considerados como productos tóxicos del metabolismo capaces de producir daño a lípidos, proteínas y DNA [47]. Para la protección frente ROS el organismo posee sistemas antioxidantes compuestos por moléculas de bajo peso

(tocoferoles, ácido ascórbico, carotenoides, etc.) y enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (Figura 1). En base a esto, el estrés oxidativo se define como un desbalance en el cual la generación de ROS sobrepasa a la capacidad antioxidante celular [48]. Bajo condiciones de estrés oxidativo agudo, las células normalmente incrementan la actividad y expresión de enzimas antioxidantes como un mecanismo compensatorio de protección frente al posible daño inducido por los radicales libres. Sin embargo, en condiciones de estrés oxidativo muy elevado o crónico, la expresión y actividad de las enzimas antioxidantes pueden encontrarse disminuidas [49]. El estrés oxidativo ha sido relacionado con una gran cantidad de enfermedades como la aterosclerosis, fibrosis pulmonar, cáncer, diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas y envejecimiento [50-55]. Sin embargo, la evidencia acumulada hasta el momento indica que bajos niveles, o niveles fisiológicos de ROS, actúan como importantes moléculas de señalización. Se han descrito funciones esenciales a nivel celular en la respiración mitocondrial, producción de prostaglandinas, defensa del huésped, mantención de un balance vasoactivo, proliferación celular, diferenciación y apoptosis, entre otros [56, 57]. Un ejemplo claro del rol que cumplen ROS a nivel fisiológico lo constituye el radical óxido nítrico (NO•), que tiene funciones regulatorias y efectos citotóxicos dependiendo de la cantidad de éste generada. Por ejemplo, en bajos niveles NO media efectos vasodilatadores cuando es generada por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS, constitutiva) [58] y como agente altamente oxidante y proinflamatorio contra microorganismos cuando es generado en altas concentraciones por la NOS inducible (iNOS) en macrófagos [59]. En conclusión, existen niveles fisiológicos necesarios de ROS que son principalmente regulados por el sistema antioxidante celular.

Superóxido dismutasa (SOD)

SOD es la primera línea de defensa frente a ROS. Existen 3 isoformas clasificadas como metaloproteínas capaces de dismutar al $\bullet\text{O}_2^-$ en H_2O_2 y O_2 . El

radical $\bullet\text{O}_2^-$ por sí solo no es tan dañino, pero puede reaccionar con el $\text{NO}\bullet$ y generar un fuerte oxidante, peroxinitrito (ONOO^-), a una constante de disociación (K_d) $\sim 6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [60]. Dos de las isoformas de SOD poseen Cobre (Cu) y Zinc (Zn) en su centro catalítico, una localizada en compartimientos citoplasmáticos intracelulares (CuZn-SOD o SOD1) mientras que otra isoforma es extracelular (EC-SOD o SOD3).

SOD1 posee una masa molecular de 32.000 Da y se ha encontrado en el citoplasma, compartimientos nucleares y lisosomas de células de mamíferos [61, 62]. SOD1 está constitutivamente expresada, pero sus niveles de mRNA se pueden regular por varias condicionantes fisiológicas como el *shear stress* [63], radiación UVB [64], metales pesados [65], peróxido de hidrógeno [66], ozono [67], óxido nítrico [68], y ácido araquidónico [69]. Se ha demostrado una regulación negativa de SOD1 en células epiteliales alveolares tipo II luego de una exposición a hipoxia [70].

SOD3 fue la enzima más recientemente descubierta y más estudiada. Se caracteriza por ser un homotetrámero con peso molecular de 135.000 Da con alta afinidad a heparina [71] con una constante de disociación (K_d) $\sim 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [72]. La expresión de SOD3 parece restringida a unos pocos tipos celulares en diversos tejidos. Altos niveles se han encontrado en células alveolares tipo II [73], células musculares lisas vasculares [74] y macrófagos pulmonares [75]. Como fuertes estimuladores de SOD3 se ha identificado a $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$ en distintos tejidos [76]. A nivel vascular, SOD3 aumenta su expresión en respuesta a agentes vasoactivos, tales como histamina, vasopresina, oxitocina, endotelina-1, angiotensina-II, serotonina, heparina y heparán sulfato [77].

Una tercera isoforma posee manganeso (Mn) como cofactor y ha sido localizada en la mitocondria de células aeróbicas (Mn-SOD o SOD2) [78]. SOD2 también es un homotetrámero con peso molecular por subunidad de 23.000 Da y ha mostrado participar en promover diferenciación celular, tumorigénesis y protección contra la toxicidad producida por hiperoxia [79, 80]. SOD2 es estimulada principalmente por citoquinas [81], $\text{TNF-}\alpha$ [82], lipopolisacáridos [83] e $\text{IFN-}\gamma$ [84]. Un potente regulador negativo de SOD2 es el factor de transcripción AP-2 [85]. A la vez,

SOD2 posee regulación postranscripcional en una unión proteica específica a su mRNA que incrementa su eficiencia de traducción [86].

La ontogenia de la regulación de las enzimas SOD es fundamental para la adaptación del feto frente al ambiente oxigenado luego del nacimiento. El pulmón es la primera barrera para la protección del recién nacido contra los radicales de oxígeno, es por eso que todas las SOD aumentan considerablemente justo antes del nacimiento en pulmón de fetos de oveja [87] y conejo [88]. Es más, la ausencia de SOD2 se ha relacionado con muerte neonatal [89].

Catalasa (CAT)

Catalasa es una enzima tetramérica que contiene 4 subunidades idénticas de 60 kDa, con un grupo de ferroporfirina IX en cada una y una masa molecular total de 240 kDa [90]. Se encuentra prácticamente en todos los organismos, y en mamíferos se ubica casi exclusivamente en peroxisomas. Su mayor rol es remover el H₂O₂ durante la α -oxidación de ácidos grasos en peroxisomas. Es una de las enzimas más eficientes que se conocen, pudiendo descomponer millones de moléculas de H₂O₂ cada segundo (~10⁷ M/seg) [91]. Sin embargo y a pesar de su alta tasa de recambio, catalasa no es eficiente en eliminar bajos niveles de H₂O₂ ya que es difícil que se sature con H₂O₂ y su ciclo catalítico requiere la interacción de 2 moléculas de H₂O₂ con un único sitio activo, lo que es poco probable que ocurra cuando hay concentraciones de H₂O₂ menores 10⁻⁷ mol/L [92]. En tejido de mamíferos, la actividad de catalasa es alta en hígado y eritrocitos, relativamente alta en riñones y tejido adiposo, intermedio en pulmones y páncreas, y muy baja en corazón y cerebro [93]. Si bien CAT no es esencial para algunos tipos celulares en condiciones normales, juega un rol primordial en la adquisición de tolerancia frente al estrés oxidativo [94], inflamación [95], mutagénesis [96] y prevención de apoptosis [97]. Poco se sabe de la regulación de esta enzima, pero se ha observado que un aumento de H₂O₂ genera un incremento dosis-dependiente de CAT mRNA observado en células epiteliales traqueobronquiales [98]. El receptor activador de la proliferación

de peroxisomas- γ (PPAR γ) estimula también al mRNA de CAT y protege contra el daño oxidativo en cardiomiocitos [99]. Además, su degradación es regulada por ubiquitinización a través de las tirosina kinasas c-Abl y Arg [100].

Glutación Peroxidasa (GPx)

Las glutación peroxidases (GPxs) pertenecen a una familia de enzimas filogenéticamente relacionadas [101]. Las GPx 1-4 en mamíferos son selenoproteínas con una selenocisteína en su centro catalítico y catalizan la reducción de H₂O₂ o hidroperóxidos orgánicos en agua o alcoholes a expensas de glutación reducido (GSH) (Figura 1) [102]. GPxs funcionan como antioxidantes en distintas localizaciones y compartimientos celulares. GPx1 se ubica en citosol y mitocondria, GPx2 en el epitelio intestinal, GPx3 en el plasma, GPx4 protege a membranas del daño oxidativo. De las otras isoformas conocidas, GPx5 contiene una cisteína en su centro catalítico y se localiza principalmente en el epidídimo [103]. GPx6 es una selenoproteína encontrada solo en humanos y expresada en el epitelio olfatorio [104]. GPx7 y GPx8 contienen cisteína en su centro activo pero poseen baja actividad enzimática [102].

GPx1 fue la primera selenoproteína identificada [105]. Es un homotetrámero que reacciona con H₂O₂ e hidroperóxidos de bajo peso molecular y es considerada como la GPx representativa en defensa antioxidante. Sin embargo ratones *knock out* para GPX1 se desarrollan de forma normal, lo que indica que la falta de esta defensa antioxidante puede ser compensada por otras proteínas o que el estrés oxidativo leve no causa ningún daño en ausencia de GPx1 [106]. En contraste GPx1 juega un rol primordial en la sobrevivencia de ratones expuestos a estrés oxidativo agudo o severo [107]. Otras funciones importantes de GPx1 se han asociado con inflamación [108], diabetes [109] y cáncer [110].

GPx2 también es un homotetrámero muy relacionado a GPx1. Ubicada principalmente en el tracto gastrointestinal incluyendo el epitelio esofágico y en el

hígado, por lo que ha sido considerada como barrera contra la absorción de hidroperóxidos en los alimentos [111]. A su vez a nivel gastrointestinal se han identificado acciones anticancerígenas [112] y antiinflamatorias [113].

GPx3 es similar a GPx1 en eficiencia contra hidroperóxidos. Se ubica en el medio extracelular, principalmente en el plasma. Es sintetizada en el túbulo proximal del riñón y secretada basolateralmente al plasma [114]. También se ha detectado en la glándula tiroidea [115], tejido adiposo [116] y fluido amniótico [117]. Su función específica en el organismo no se sabe con claridad, pero la ubicación preferente en membranas basales de epitelios respalda la hipótesis de actuar como un *buffer* redox discriminando entre estímulos inflamatorios mínimos o severos [117]. La regulación transcripcional de GPx3 hasta ahora no ha sido totalmente caracterizada, aunque su expresión aumenta en condiciones inflamatorias secundarias a estrés oxidativo y mediado por AP-1 [110].

Medición de estrés oxidativo

La alta reactividad e inestabilidad de ROS los hacen difíciles para su medición en sistemas biológicos, es por eso que su análisis se realiza de forma indirecta mediante la determinación de productos finales que resultan de la interacción de ROS con lípidos, proteínas o DNA [118]. El grupo más común como índice de medición de estrés oxidativo son los productos de lipoperoxidación, usualmente ácidos grasos poliinsaturados, que son susceptibles al ataque de radicales libres. En general el proceso de formación consiste en tres etapas: iniciación, propagación y terminación. La fase inicial consiste en la substracción de un átomo de hidrógeno que transforma al ácido graso en un radical lipídico (L•) que reacciona con el oxígeno molecular para formar un radical lipoperoxido (LOO•) y este puede substrair un hidrógeno de un ácido graso para producir un hidroperóxido (LOOH) y un segundo radical lipídico, pudiendo este proceso propagarse y generar una reacción en cadena (etapa de propagación, Figura 1) [119]. El daño de lípidos de membrana puede generar cambios en la fluidez y permeabilidad, alteraciones en el transporte de iones

e inhibición de procesos metabólicos [120]. A su vez puede dañar a la mitocondria y generar ROS a partir de ésta [121]. En la etapa de terminación, un LOOH reacciona con metales o ascorbato y genera productos aldehídos reactivos, como malondialdehído (MDA), 4-hidroxinonenal (4-HNE), 4-hidroxi-2-hexenal (4-HHE) y acroleína [122, 123]. 4-HNE es el principal aldehído que se forma durante el proceso de lipoperoxidación de ácidos grasos como el ácido linoleico y el ácido araquidónico, acumulándose en membranas biológicas a una concentración de 10 μ M a 5 mM en respuesta a estrés oxidativo [119]. El 4-HNE fue identificado hace más de tres décadas como un aldehído citotóxico induciendo peroxidación de lípidos microsomales en el hígado [124]. Actualmente es considerado como indicador de estrés oxidativo en muchos procesos patológicos [123].

Otro producto de la lipoperoxidación son los isoprostanos, los cuales son una compleja y amplia familia de productos de lipoperoxidación derivados del ácido araquidónico. Su producción en humanos fue demostrada en el año 1990 con la medición de F2-isoprostanos y desde entonces se ha usado como marcador confiable de lipoperoxidación en enfermedades humanas [125]. Dentro de la familia de los F2-isoprostanos se encuentran los 8-isoprostanos (8-Epi-prostaglandinF_{2 α}) a los cuales se les ha atribuido ser uno de los marcadores más seguros de estrés oxidativo debido a su estabilidad bioquímica [126, 127].

Malondialdehído (MDA), es el principal producto de lipoperoxidación determinado mediante el ensayo TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico) [128]. TBARS ha sido ampliamente criticado por su baja especificidad en la medición de estrés oxidativo, pero por ser un ensayo de rápida aplicación y fácilmente reproducible también es ampliamente utilizado [129].

El ácido úrico es un producto de degradación del metabolismo de las purinas y aumenta cuando incrementa la actividad de la xantino oxidasa (XO). La enzima XO es una metaloflavoproteína que es generada por la modificación de la enzima xantino deshidrogenasa (XD) [130]. Tanto XO como XD catalizan la oxidación de hipoxantina a xantina y ácido úrico, con la generación de anión superóxido en cada una de estas

reacciones [131], por lo que la medición de ácido úrico es una referencia de la cantidad de anión superóxido producido por la XO. Se describió primero la participación de la XO en fenómenos de isquemia/reperfusión [132] y luego en fenómenos de hipoxia crónica, como en la hipertensión pulmonar neonatal [133].

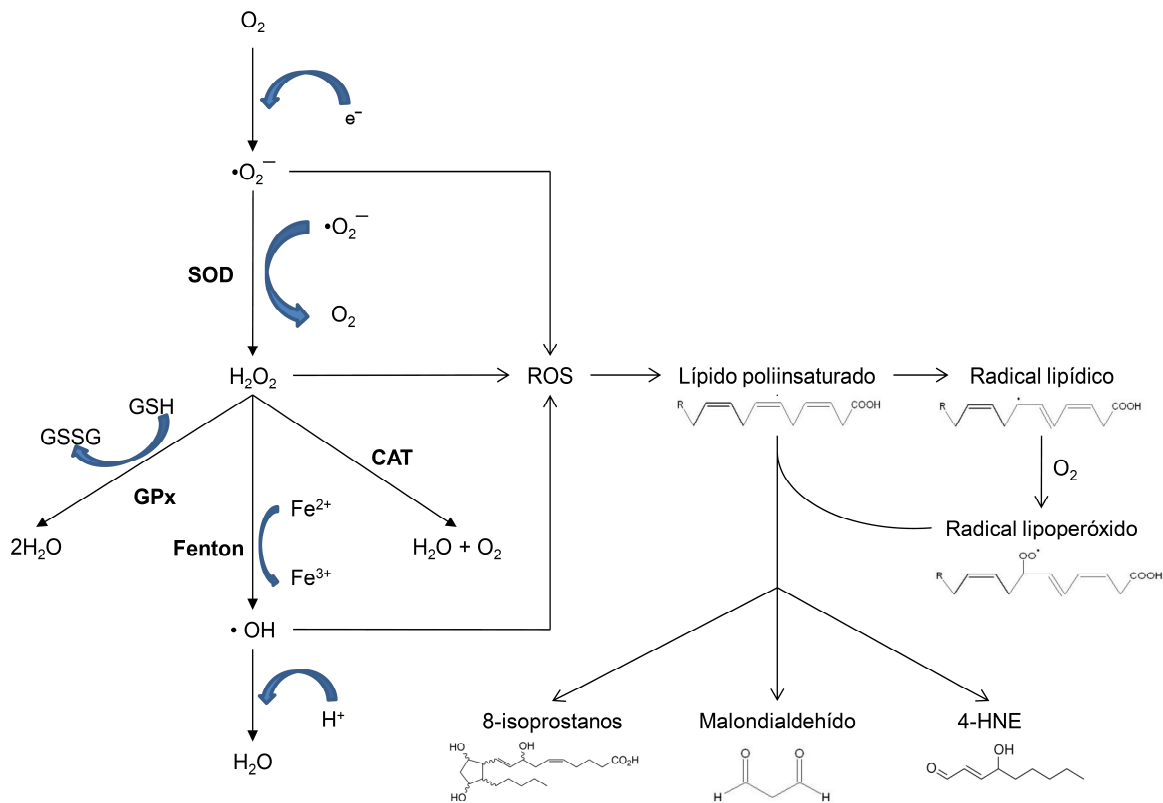


Figura 1. Principales radicales libres generados a partir del oxígeno (ROS), enzimas antioxidantes encargadas de su neutralización y efecto de ROS en lípidos.

Nuclear factor erythroid 2–related factor 2 (Nrf2)

Nrf2 es un factor de transcripción descubierto en 1994 que regula positivamente a “Elementos de Respuesta Antioxidante” (ARE) que expresan enzimas antioxidantes como la NAD(P)H:quinona oxidoreductasa 1 (NQO1) [134]. El mecanismo de activación de Nrf2 involucra a la proteína Keap1, un supresor anclado en el citoplasma que físicamente se une a Nrf2, previniendo su traslocación al núcleo

y su acceso a los promotores de la zona ARE [135]. La unión Keap1/Nrf2 funciona como un sensor de estrés oxidativo. Cuatro residuos de cisteína se han identificado en Keap1 como los candidatos más probables de sensar estrés oxidativo [136]. La función sensora oxidativa de Keap1 primariamente enlentece la ubiquitinización y consecuente degradación de Nrf2 cuando existen altos niveles de estrés oxidativo, por lo que Nrf2 se acumula en la célula en estas condiciones [137]. La fosforilación en la serina 40 de Nrf2 parece ser un evento importante en la liberación de Nrf2 de Keap1 y su traslocación al núcleo [138]. Nrf2 es expresado en una amplia gama de tejidos y tipos celulares, incluido el tejido pulmonar [139]. En estudios experimentales Nrf2 ha demostrado ser un útil protector frente a compuestos tóxicos, cancerígenos y un buen neuroprotector en la enfermedad de Parkinson [140, 141]. En respuesta a la hipoxia, se ha descrito una mayor expresión de Nrf2 en células endoteliales [142], cerebro [143], hígado y corazón [144]. A nivel pulmonar, modelos experimentales han mostrado protección frente a agentes nocivos [145], en fibrosis pulmonar [146], enfisema [147], distrés respiratorio agudo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, sepsis y cáncer pulmonar [148]. Por lo tanto, la función de Nrf2 se activa en procesos patológicos asociados a hipoxia y estrés oxidativo y este factor estaría participando en la transcripción de mecanismos protectores.

Hipoxia de altura y estrés oxidativo

Se ha demostrado que la hipoxia *per se* puede generar estrés oxidativo *in vitro* e *in vivo* [149]. Una de las principales fuentes de ROS en condiciones fisiológicas es la mitocondria y cuando la disponibilidad de oxígeno disminuye, se acumulan equivalentes reducidos en la cadena transportadora de electrones lo que lleva a la producción de radicales libres [150-152]. La exposición a la hipoxia de altura genera estrés oxidativo, esto se ha demostrado por los efectos deletéreos de radicales libres en lípidos, proteínas y DNA [153, 154]. Además del daño producido por los radicales, también existe una disminución en la capacidad antioxidante. Estudios demuestran menor expresión y actividad de SOD2 en músculo esquelético de ratas expuestas a

hipoxia crónica (4000 m) [155], menor SOD2 y GPx en hígado y pulmón de ratas expuestas a hipoxia hipobárica (5500 m) [156] y disminución de catalasa a nivel pulmonar en cobayos nativos de altura [157].

En base a lo anterior, en la hipertensión pulmonar inducida por hipoxia hipobárica o de altura, la hipoxia estaría jugando un rol relevante, ya que a través de la generación de radicales libres o estrés oxidativo estaría participando posiblemente en el origen o desarrollo de esta enfermedad. Así lo demuestran estudios hechos en ratas sometidas a hipoxia crónica que desarrollan hipertensión pulmonar [133, 158]. Una de las hipótesis que contribuye a reforzar la idea de que ROS son elementos claves en el desarrollo de hipertensión pulmonar inducida por hipoxia, es su posible participación como mediadores de la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH). Primero, se ha demostrado la generación de ROS, estrés oxidativo y lipoperoxidación en la vasculatura de arterias pulmonares secundaria a la exposición a hipoxia [159, 160]. Segundo, ROS son apropiados candidatos para ser considerados como señales de hipoxia en las células musculares lisas de arterias pulmonares porque pueden gatillar muchas vías que están involucradas en la VPH como la liberación de Ca^{+2} [161, 162], activación de la AMP quinasa [163] y Rho Quinasas [164]. Si bien O_2 es el mayor sustrato para la generación de ROS, está demostrado que en condiciones de hipoxia existe un aumento paradójico en la generación de ROS a partir de la mitocondria en muchos tipos celulares, incluidos las células musculares lisas de arterias pulmonares [165-167]. Además la mitocondria es considerada como un sensor O_2 que regula una amplia gama de respuestas celulares a la hipoxia, que van desde la activación de factores de transcripción al control del tono vascular en la circulación pulmonar [168]. En la mitocondria aproximadamente el 3% del flujo de electrones de la cadena transportadora de electrones se pierde constitutivamente y se forma $\bullet\text{O}_2^-$, lo que ocurre principalmente en el complejo I y III [169]. En condiciones de hipoxia, menos O_2 es disponible para ser reducido a H_2O en la citocromo oxidasa, causando acumulación de equivalentes reducidos en la cadena respiratoria mitocondrial. Esto es llamado estrés reductivo, que lleva a la formación de ROS por la auto-oxidación de uno o más complejos mitocondriales como el par

redox ubiquinona-ubiquinol [170]. Por otro lado, ROS generados en el complejo III mitocondrial en respuesta a la hipoxia permite estabilizar al factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1) que es capaz de mediar una serie de respuestas patogénicas en las células musculares lisas de arterias pulmonares llevando finalmente a vasoconstricción y proliferación celular [171, 172]. Lo anterior hace evidente la esencial participación de los radicales libres y el estrés oxidativo en el desarrollo de hipertensión pulmonar en condiciones de hipoxia, como es la altura.

Estrategias antioxidantes: Melatonina

Los antioxidantes son sustancias que protegen a las células del daño causado por los radicales libres, interactuando con ellos y estabilizándolos. La oxidación es una reacción química que transfiere electrones desde una sustancia hacia un agente oxidante. Esta reacción puede producir radicales libres que inician una respuesta en cadena causando daño celular. Los antioxidantes pueden terminar estas reacciones sustrayendo los radicales libres intermediarios e inhibiendo otras reacciones de oxidación, oxidándose ellos mismos. Como resultado, antioxidantes no enzimáticos son usualmente agentes reductores como tioles, ácido ascórbico y polifenoles [48]. Como el estrés oxidativo es parte importante en la causa o desarrollo de muchas enfermedades, el uso de antioxidantes en farmacología ha sido intensamente estudiado [173-177]. Si bien existe un gran número de estudios que demuestran los efectos positivos del uso de antioxidantes en experimentos animales, estudios de ensayos clínicos aún no han mostrado reales beneficios de su uso, e incluso en algunos casos han tenido efectos deletéreos [178-184]. A pesar de lo anterior, en la última década se han propuesto muchas alternativas antioxidantes. Uno de los más promisorios es el uso de melatonina, una neurohormona endógena, que se perfila como un efectivo antioxidante, con características que la hacen diferente a los antioxidantes tradicionales.

Melatonina es una neurohormona secretada por la glándula pineal, cuya síntesis y liberación está determinada por el fotoperíodo, alcanzando un *peak*

máximo durante la noche [185]. En el feto, la glándula pineal produce niveles muy bajos de melatonina. Sin embargo, la melatonina proveniente de la madre es capaz de ser transferida a la circulación fetal a través de la placenta, la que aumenta conforme avanza la gestación [186]. Luego del nacimiento, el recién nacido tarda en alcanzar los niveles plasmáticos de melatonina presente en el adulto (en neonato de oveja alrededor de 2-4 semanas [187], en humanos 2 – 4 meses [188]). Melatonina no sólo cumple funciones de regulador circadiano, sino que además es un modulador de una miríada de funciones celulares, entre ellas como poderoso antioxidante. Los efectos antioxidantes están dados por su capacidad *scavenger* o neutralizador de ROS, pudiendo reclutar al potente radical hidroxilo (OH•) a una constante de reacción del orden de $2,7 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ [189], y acciones mediadas a través de 2 receptores identificados (MT1 y MT2) que incluyen el aumento de expresión de enzimas antioxidantes [190], la disminución de mecanismos pro-oxidantes [191] y la activación de quinona reductasa 2, que está involucrada en detoxificación de quinonas prooxidantes [192]. Melatonina puede fácilmente cruzar membranas celulares y la barrera hematoencefálica [193]. A diferencia de otros antioxidantes, melatonina no es sometida a ciclos redox, que es la capacidad de una molécula de oxidarse y reducirse repetidamente. Los ciclos redox permiten a otros antioxidantes (como vitamina C) actuar como pro-oxidantes y promueven la formación de radicales libres. En contraste, melatonina no puede reducirse a su estado de origen una vez oxidada ya que forma una cascada de productos finales estables al actuar con radicales libres, por lo que se ha designado a melatonina como un antioxidante de término [194, 195]. Estudios comparativos de la efectividad de melatonina, la sitúan como un potente reclutador de radicales libres más eficiente que vitamina C, trolox (análogo de vitamina E), glutatión y NADH [196]. Sumado a estos, existen otros efectos ejercidos por melatonina como la vasodilatación directa de arterias cerebrales [197] y umbílico-placentarias [198] en el feto, y vasodilatador en tronco pulmonar en ratas [199]. Además, en el adulto se han descrito muchos otros efectos benéficos como protector del sistema cardiovascular [200-202]. Una de las grandes ventajas en el uso terapéutico de melatonina es que aún no se le han descrito dosis tóxicas, ni siquiera en dosis muy por sobre las terapéuticas. En un estudio se evaluó la toxicidad

materna de melatonina en ratas, donde se administró dosis de hasta 200 mg/kg/día durante el periodo gestacional, no mostrando tener algún efecto en la sobrevivencia prenatal, peso fetal o incidencias en malformaciones [203]. Por lo anterior, el uso de melatonina ha demostrado potencial terapéutico en diversas patologías relacionadas con estrés oxidativo como la asfixia perinatal, sepsis neonatal, síndrome de distrés respiratorio y displasia broncopulmonar [204-206]. Sin embargo aún no se han realizado estudios que muestren beneficios del uso de melatonina en la hipertensión pulmonar neonatal. Es por esto que el presente trabajo de tesis propone demostrar los efectos antioxidantes de melatonina a nivel pulmonar de neonatos de oveja con hipertensión pulmonar, gestados en hipoxia crónica de altura (Figura 2).

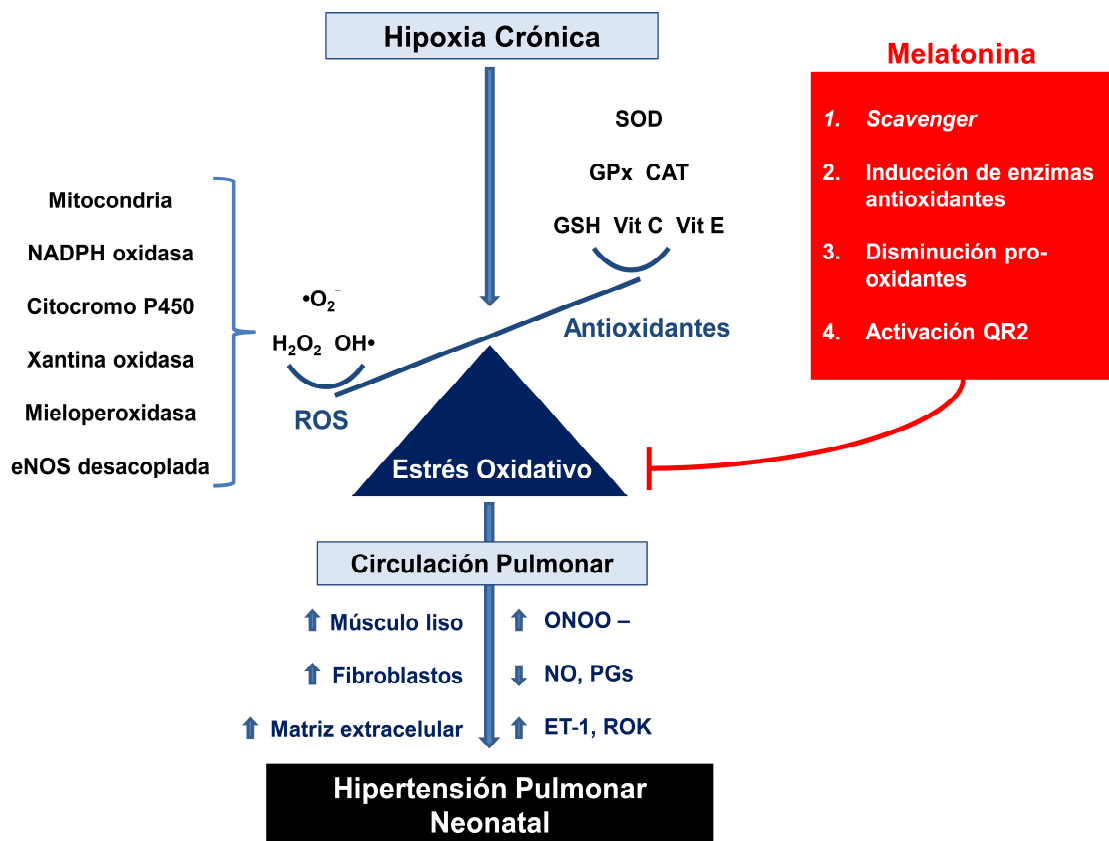


Figura 2. Principales mecanismos involucrados en el desarrollo de hipertensión pulmonar persistente neonatal en la altura y potenciales efectos de melatonina.

HIPÓTESIS

El tratamiento con melatonina aumenta la capacidad antioxidante enzimática y reduce el estrés oxidativo a nivel pulmonar en el neonato de oveja gestado y nacido en hipoxia crónica.

OBJETIVOS

General

Determinar si la administración de melatonina logra aumentar la capacidad enzimática antioxidante y reducir el estrés oxidativo a nivel pulmonar, en el neonato de oveja con hipertensión pulmonar.

Específicos

En neonatos de oveja, gestados y nacidos en hipoxia crónica de altura, determinaremos los siguientes objetivos específicos en tejido pulmonar:

Capacidad antioxidante

- Expresión de mRNA y de proteína de SOD, CAT y GPx.
- Actividad de enzimas antioxidantes: SOD, CAT, GPx.

Biomarcadores de estrés oxidativo

- Productos de estrés oxidativo: 8-isoprostanos, TBARS, ácido úrico y expresión proteica de 4-HNE.

Sensor redox

- Cuantificación proteica de Nrf2.

METODOLOGÍA

Todos los manejos animales y experimentos propuestos en este estudio fueron aprobados por el Comité de Bioética sobre investigación en animales (CBA#0398 FMUCH) de la Universidad de Chile y por el Comité asesor de Bioética de FONDECYT (N°018/FONDECYT/Medicina/0097) y se llevaron a cabo según las normas internacionales establecidas en *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health* (NIH Publication No. 85–23, revised 1996).

Modelo experimental

Se utilizó como modelo experimental a recién nacidos de oveja gestados y nacidos en hipoxia hipobárica de altura. Este modelo fue desarrollado y perfeccionado en las instalaciones del Centro Internacional de Estudios Andinos (INCAS, por sus siglas en inglés), por investigadores del Programa de Fisiopatología, Facultad de Medicina Universidad de Chile [24, 40-45]. El INCAS se encuentra en Putre (XV Región), a 3600m de altura, donde se llevó a cabo la gestación y el nacimiento de los neonatos estudiados. El ambiente de hipoxia crónica a esta altura es suficiente para generar cambios en la circulación pulmonar e hipertensión pulmonar [41, 43, 207]. En base a este modelo, se obtuvieron 12 recién nacidos de oveja (*Ovis aries*) que fueron gestados y nacidos en altura. A partir de estos animales, se establecieron 2 grupos. El grupo control recibió vehículo (Etanol 1,4% 0,5 mL·kg⁻¹, n=6) y el grupo tratado recibió melatonina (1 mg·kg⁻¹ en Etanol 1,4% 0,5 mL·kg⁻¹, n=6). Ambos grupos recibieron la dosis por vía oral, diariamente a las 18:00 h a partir del día 4 hasta el día 11 (Figura 3). En el día 3, bajo anestesia general (Ketamina 10 mg·kg⁻¹ I.M. + Xilacina 0,04 mg·kg⁻¹ I.M.), se instalaron catéteres de polivinilo en aorta descendente y en vena cava inferior los cuales fueron mantenidos durante el período experimental. Se extrajeron 2 muestras de sangre venosa por día (AM y PM), en 3 días del tratamiento (4, 8 y 12 días) para su posterior análisis. Al

final del período de tratamiento los animales fueron eutanizados con una sobredosis de tiopental sódico (100 mg.kg^{-1} e.v., Opet, Laboratorio Chile) y mediante disección se obtuvo tejido pulmonar (Figura 3). Todas las muestras fueron inmediatamente congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -197°C hasta su utilización.

El modelo experimental presentado conforma parte de un gran proyecto de trabajo Fondecyt (1110595) de 4 años, por lo que el manejo instrumental que se realizó a los animales estuvo destinado a la obtención de material e información suficientes para dar respuesta a varias otras interrogantes, complementarias con los objetivos planteados en esta tesis.

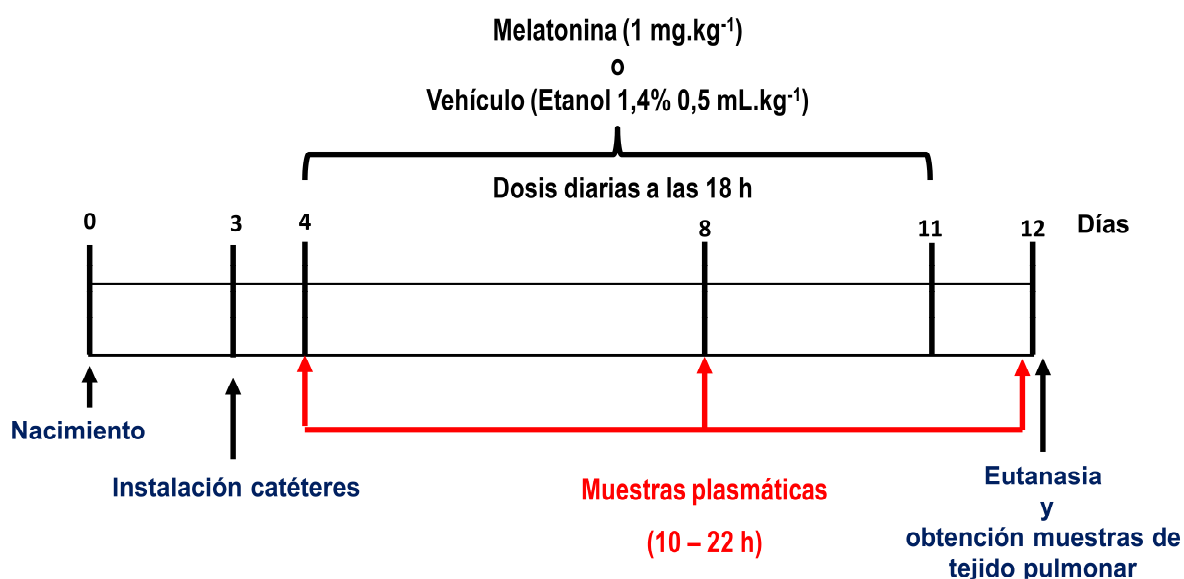


Figura 3. Esquema de los días de tratamiento y obtención de muestras (plasma y tejido pulmonar).

Determinaciones

Expresión génica pulmonar

Se realizó la medición de expresión de mRNA mediante RT-PCR semicuantitativo para las enzimas SOD, CAT y GPx. Para esto se generaron partidores, diseñados a partir del alineamiento de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los genes de interés de otras especies, tales como: rata (*Rattus norvegicus*), ratón (*Mus musculus*), humano (*Homo sapiens*), perro (*Canis lupus familiaris*), vaca (*Bos taurus*), gato (*Felis catus*) y en oveja (*Ovis aries*), disponibles en Entrez nucleotide (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>) y Entrez protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=Protein>). Dado que no hay registro previo de estos genes en oveja las secuencias fueron alineadas por medio del programa ClustalW (<http://align.genome.jp>). Los partidores se eligieron de regiones con alta conservación entre especies y poca variabilidad codogénica. De la lista de partidores generados se seleccionaron los que presentaron la amplificación por RT-PCR del tamaño teórico esperado para dicho par de partidores, los que se muestran en la Tabla 1.

RT-PCR semicuantitativo.

Se preparó RNA total de acuerdo a protocolos previamente publicados [208]. Para la síntesis de cDNA se mezclaron 2 µg de RNA total con 50 ng de partidores tipo Random hexamers (stock a 50 ng/µL), y un mix de dNTPs (stock a 10 mM) y se desnaturaron (70 °C x 5 min) en termociclador, para prevenir la formación de estructuras secundarias. Posteriormente, se realizó la transcripción reversa por adición de un medio de reacción: 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 30 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP, 40 unidades del inhibidor de RNasa y 50 unidades de transcriptasa reversa (RevertAidMR H Minus M-MuLV RT, Molone Murine Leucemia Virus Reverse Transcriptase, Fermentas, Canadá) en un volumen final de 20 µL. Se

realizó incubación por 10 minutos a 25 °C para provocar el apareamiento, luego por 50 minutos a 42 °C para la síntesis del cDNA y finalmente por 15 minutos a 70 °C para detener la reacción.

Tabla 1. Partidores y condiciones experimentales utilizados para RT-PCR de SOD, CAT y GPx.

Gen	Nombre Primer	Secuencia	T _m (°C)	Largo (nucleótidos)	Tamaño producto
<i>Catalasa</i>	CatOvF2 CatOvR1	5'-AAATGGCTCACTTTGACCGGGAGA-3' 5'-AATTCACCTGCAAAGCCACGAGGG-3'	60,3 60,1	24 24	229
<i>SOD2</i>	SO2OvF3 SO2OvR3	5'-CGGTGGTGGAGAACCCAAAGGG-3' 5'-CTGCAAGCTGTGTATCGTGCAGTT-3'	58 59,6	22 24	339
<i>SOD3</i>	SO3OvF2 SO3OvR2	5'-GACCTGAGCCAGGCTGCGA-3' 5'-TTACCGTTCTCCAGACTGGCCTGATT-3'	64,7 61,2	20 26	242
<i>Gpx 1</i>	GP1OvFor3 GP1OvRev3	5'-CTGGTCGTGCTCGGCTTCCC-3' 5'-GGGTCGGTCATGAGAGCAGTGG-3'	63,2 61,8	20 22	230
<i>Gpx 3</i>	GP3OvFor1 GP3OvRev1	5'-CCCTGCTCCTGGCCGGCTT-3' 5'-TTGGTTGCAGGGGAAGCCCA-3'	65,8 62,3	19 20	275

Partidores diseñados, enviados a sintetizar y probados en RT-PCR para SOD, CAT y GPx. Además, se muestran la temperatura de alineamiento y el tamaño de producto esperado.

Una vez completa la reacción de transcripción reversa, el remanente de RNA se eliminó mediante tratamiento con 2 unidades de RNasa H por 20 minutos a 37 °C.

La amplificación de secuencias parciales de cDNA de SOD, CAT, GPx, y 18SrRNA se realizó a partir de una alícuota de cDNA procedente de 0,2 µg de RNA total, con 1 unidad de Taq polimerasa (Promega, USA) en 10 mM Tris HCl pH 8,0, 50 mM KCl, 0,1 % Tritón X-100, 2 mM MgCl₂ para las enzimas antioxidantes y 1,5 mM MgCl₂ para 18SrRNA, 200 µM dNTP y 0,1 µM de cada uno de los partidores. Para todas las reacciones, se realizaron ensayos preliminares para determinar el número de ciclos de PCR hasta la saturación. Los experimentos definitivos fueron realizados con el número de ciclos establecidos en dicho ensayo.

Los productos de reacción de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % con bromuro de etidio en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE). Las señales se visualizan por transiluminación con luz UV, se digitalizan con un sistema de fotoadquisición (Kodak DC-120 equipado con software Kodak Digital Science 1D versión 2.03) y la intensidad se cuantificó por densitometría con el software Scion Image (Scion Image Beta 4.02; Scion Corporation, USA).

Expresión proteica pulmonar

Se realizó Western blot para determinar el nivel proteico de las enzimas antioxidantes SOD2, CAT y GPx1, el producto de lipoperoxidación 4-HNE y el factor de transcripción Nrf2. Se realizó homogenización de tejido pulmonar de acuerdo a protocolos previamente publicados [40, 209], los cuales son adecuados para medir proteínas citoplasmáticas. Brevemente, 150 – 300 mg de tejido pulmonar fue lisado en *buffer* de lisis (63,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 10% glicerol, 2% SDS, 1 mM ortovanadato de sodio, 50 mg/mL leupeptina y 5% 2-mercaptoetanol) y centrifugado a 5000 g x 10min a 4°C para obtener un sobrenadante como muestra para realizar Western blot.

Western blot

Los lisados de proteína (0,5-30 µg según proteína) fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (4% de gel concentrador y 10% de gel de corrida) con una cámara DCX-700 (Dual Cool Mini-Vertical PAGE/Blotting System California, EE.UU.), realizándose a un voltaje constante de 40 mA por 1 h aproximadamente. Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas separadas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham, Germany) mediante un amperaje constante de 50mA por 2 h. Las membranas fueron bloqueadas con leche semidescremada al 4% p/v en PBS 1X durante 1 h y posteriormente incubadas durante 1 h con anticuerpos primarios policlonales

comerciales para cada una de las proteínas SOD2, CAT y GPx1, 4-HNE, Nrf2 y β -actina (Tabla 2). Las membranas fueron lavadas en PBS-Tween e incubadas por 1 h en PBS Tween 0,1%/ leche 0,4%, conteniendo un anticuerpo secundario conjugado con *horseradish-peroxidase* (HRP). Las proteínas estudiadas fueron detectadas incubando las membranas en un reactivo de quimioluminiscencia (Pierce ECL, Thermo Scientific, Rockford, IL, EEUU) y revelados en placa radiográfica. Las señales obtenidas en las placas fueron escaneadas digitalmente y analizadas por densitometría con el software Scion Image (Scion Image Beta 4.02; Scion Corporation, USA), las cuales fueron expresadas como razón contra β -actina.

En primera instancia se realizó Western blot para determinar la carga proteica adecuada de cada enzima para el ensayo definitivo, siendo las siguientes: para β -actina y CAT 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de muestra, GPx1 y 4-HNE 30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, Nrf2 y SOD2 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Tabla 2. Anticuerpos y condiciones experimentales utilizados para WB.

Anticuerpo	Tipo	Hospedero	Peso Molecular	Concentración - Cantidad (Stock)	Western Blot	
					Concentración Teórica	Concentración Práctica (carga prot)
<i>Anti-Mn-SOD</i>	Policlonal	Conejo	~24 kDa	1 mg/mL – 200 μg	0,5 – 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1:500)	1:1000 (10 μg)
<i>Anti Catalase</i>	Policlonal	Conejo	~65 kDa	10 mg/mL – 1 mL	1:1000 – 1:5000	1:8000 (0,5 μg)
<i>Anti Gpx 1</i>	Policlonal	Conejo	~22 kDa	0,5 mg/mL – 100 μg	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1:500)	1:1000 (30 μg)
<i>Anti 4-HNE</i>	Policlonal	Conejo	Multibandeo	0,9 mg/mL – 100 μg	1:500	1:1000 (30 μg)
<i>Anti Nrf2</i>	Policlonal	Conejo - Cabra	~68 kDa	0,2 mg/mL – 500 μL	1:1000	1:1000 (10 μg)
<i>B-actina</i>	Policlonal	Ratón	42 kDa	0,2 mg/mL	1:5000	1:5000 (0,5 μg)

Características de los anticuerpos comerciales utilizados para los experimentos de WB. Además, se muestran información relevante de los protocolos determinados.

Actividad enzimática pulmonar

Superóxido dismutasa (SOD)

Para el análisis de la actividad enzimática de SOD se utilizó un ensayo comercial (SOD Assay Kit-WST, BioVision, #K335-100). El ensayo se basa en la utilización de WST-1 que emite coloración luego de reducirse en contacto con el anión superóxido. La razón de la reducción con el anión superóxido es linealmente relacionada con la actividad de la xantino oxidasa y es inhibida por SOD. Por lo tanto la actividad inhibitoria de SOD puede ser determinada mediante un método colorimétrico. El homogenizado de tejido se realizó en frío con 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4 con 0,5% Triton X-100, 5 mM β -ME, 0,1 mg/mL de PMSF para luego centrifugar a 14000 x g por 5 minutos a 4° C. El sobrenadante obtenido contiene la actividad de SOD total, tanto citosólica como mitocondrial (SOD1 y SOD2 respectivamente). Se utilizan 20 uL de muestra para aplicar el protocolo de ensayo según especifica el kit, y el resultado obtenido se lee a una absorbancia de 450 nm. Con la medición de la absorbancia se utiliza una ecuación que arroja el resultado expresado como porcentaje de inhibición, equivalente a la actividad de SOD intracelular.

Catalasa (CAT)

Para la medición de la actividad de CAT se utilizó un ensayo comercial (OxiSelect™ Catalase Activity Assay Kit, Colorimetric, Cell Biolabs, INC., # STA-341). El ensayo involucra 2 reacciones. En la primera CAT, descompone al H_2O_2 en agua y oxígeno. La tasa de desintegración del H_2O_2 es proporcional a la concentración de CAT. Una muestra que contenga CAT se puede incubar con una concentración conocida de H_2O_2 . La reacción procede por 1 minuto para ser detenida con azida de sodio. El remanente de H_2O_2 facilita el acoplamiento de la segunda reacción donde se une al 2,5 - dihidroxi - bencenosulfonato (DHBS), peróxido de acetil acetona (AAP) y a la peroxidasa del rábano (HRP), formando un producto colorante de

quinonaemina que es leído a 520 nm. Para la preparación del tejido se realizó de acuerdo a la recomendación del ensayo: se homogenizó aproximadamente 100 mg de tejido pulmonar con 10 mL de PBS en frío, con 1 mM de EDTA. Luego se centrifugó a 10.000 x g por 15 minutos a 4°C. Se obtuvieron 20 µL del sobrenadante para realizar la medición según protocolo estandarizado del ensayo. En base a una curva estándar se calcularon los resultados obtenidos y se expresaron como U/mL. Luego el resultado se estandarizó en base a la concentración proteica de cada muestra, la cual se determinó por ensayo de Bradford que se describe más adelante.

Glutación Peroxidasa (GPx)

Para el análisis de la actividad de GPx se utilizó un ensayo comercial (Glutathione Peroxidase Assay Kit, Cayman, # 703102) que mide la actividad de GPx de forma indirecta por una reacción acoplada a la glutatión reductasa (GR). El glutatión oxidado (GSSG), producido por la reducción de hidroperóxidos por la GPx, es reciclado a su estado reducido por la GR y NADPH. La oxidación de NADPH a NADP⁺ es acompañada por una disminución en la absorbancia a los 340 nm. Bajo condiciones en las cuales la actividad de GPx es limitante, la tasa de disminución en la A_{340} es directamente proporcional a la actividad de GPx en la muestra [210]. Según el protocolo, la muestra de tejido pulmonar se homogenizó en frío con 10 mL de buffer (50 mM Tris-HCl, pH7,5, 5 mM de EDTA y 1 mM de DTT), para luego centrifugar con 10000 x g por 15 min a 4° C. 20 µL del sobrenadante se usaron para proceder con el ensayo y 10 µL para estandarización proteica con Bradford como se describe más adelante. Con los datos de la absorbancia se realizaron cálculos con la ecuación otorgada por el protocolo del ensayo que incluía un coeficiente de extinción de NADPH a 340 nm ($0,00373 \mu\text{M}^{-1}$). Los resultados se expresaron como nmol/min/mL. Datos anexos del ensayo en cuanto a precisión: con 77 mediciones de GPx realizadas el mismo día, el coeficiente de variación intra-ensayo fue de 5,7% y con 77 mediciones realizadas en 5 días diferentes bajo las mismas condiciones experimentales, el coeficiente de variación intra-ensayo fue de 7,2%.

Estandarización proteica con método de Bradford

Para la estandarización de la muestra de los distintos ensayos aplicados, se realizó medición de proteínas totales según método de Bradford. Brevemente, se realiza una mezcla en tubos Khan que contiene 10 μ L de diluciones de la muestra, 790 μ L de agua destilada y finalmente 200 μ L de reactivo de Bradford (Bio-Rad California, EE.UU) para ser incubada por 20 minutos y luego leer en espectrofotómetro a 595 nm. Se estandarizaron las mediciones de absorbancia en base a una curva estándar realizada con diluciones de albúmina sérica bovina (BSA) en rango 0,3 – 1,5 μ g.

Marcadores de estrés oxidativo

8-isoprostanos

Como medidor confiable de lipoperoxidación [211], se realizó el análisis 8-isoprostanos (8-iso Prostaglandin $F_{2\alpha}$) en tejido pulmonar utilizando un kit comercial colorimétrico (8-Isoprostane EIA kit, Cayman Chemical Company, MI, USA, 516351). El ensayo se basa en la competición entre 8-isoprostanos y una 8-isoprostano acetilcolinesterasa (AChE) conjugada (8-isprostane Tracer) con sitios de unión fijos para un anticuerpo sérico específico de 8-isoprostanos. Como la concentración del trazador (tracer) se mantiene constante mientras la de 8-isoprostanos de la muestra varía, la cantidad de trazador unida al anticuerpo sérico será inversamente proporcional a la concentración de 8-isoprostanos en la placa de medición. El producto de la reacción enzimática da una coloración amarilla que absorbe a 412 nm y puede ser medido espectrofotométricamente. La preparación del tejido se realizó según las indicaciones del kit homogenizando 100 mg de muestra aproximadamente, en 1 mL de buffer (0,1 M de fosfato, pH 7,4, 1 mM de EDTA y 0,005 % BHT) por 100 mg de tejido, centrifugando luego a 8.000 x g por 10 minutos. 50 μ L del sobrenadante se utilizaron para realizar el ensayo propiamente tal y 10 μ L para realizar la

normalización de la muestra por medición proteica con ensayo de Bradford descrito previamente.

4-HNE

El compuesto aldehído 4-hidroxinonenal es un producto estable de lipoperoxidación ubicado preferentemente en citoplasma. Se realizó su cuantificación proteica en homogenizado total de tejido pulmonar mediante Western blot (descrito previamente), usando un anticuerpo comercial policlonal anti-4-Hydroxy-2-Nonenal y con una carga proteica de 30 µg por muestra.

Ácido Úrico

Para la medición de ácido úrico se utilizó un kit comercial (Uric Acid Assay Kit, BioAssay Systems, CA, USA). El ensayo permite medir de forma rápida y directa la presencia de ácido úrico en la muestra analizada, mediante la utilización de 2,4,6-tripiridil-s- tiazina que forma un compuesto azulado con fierro en presencia de ácido úrico. La intensidad de la coloración se puede medir a 590 nm y es directamente proporcional a la concentración de ácido úrico. La muestra se homogenizó en 1 mL de buffer (0,1 M de fosfato, pH 7,4, 1 mM de EDTA y 0,005 % BHT) por 100 mg de tejido aproximadamente, centrifugando luego a 8000 x g por 10 minutos. Del sobrenadante resultante se obtuvieron 5 µL para realizar el ensayo y 10 µL para realizar la normalización de la muestra por medición proteica con ensayo de Bradford descrito previamente.

TBARS

Para el análisis de TBARS se realizó su medición según método descrito por Ohkawa y cols [212] en tejido pulmonar. Brevemente: se realiza un homogenizado

del tejido a analizar, 100 a 200 mg, en buffer KCl 1,15% y se centrifuga a 5000 g x 10 minutos, obteniéndose un sobrenadante que se utiliza para la reacción de coloración y 10 µL para medición de proteínas por Bradford, como se describió previamente. En la reacción de coloración se mezclan 100 uL de sobrenadante con 100 uL de SDS 8,1%, 750 uL ácido acético 20% pH 3,5, 750 uL TBA 0,8% y 300 uL de H₂O. La mezcla se incuba a 95° por 60 minutos para luego agregar 500 uL H₂O y 2,5 mL de n-butanol-piridina y se agita vigorosamente para luego centrifugar a 4000 rpm por 10 minutos. La fase superior resultante se lee a una absorbancia de 532 nm. Como patrón externo de MDA se utiliza 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMP). Los niveles de peroxidación lipídica se expresan como nmoles de MDA/g de tejido.

Análisis estadístico

Se realizó análisis exploratorio de los datos obtenidos y se determinó el cumplimiento de criterios de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk. En base a esto, ambos grupos fueron comparados mediante la prueba de t-test no pareado y los resultados fueron expresados como promedio ± ESM. Se aceptó una diferencia significativamente estadística si el valor de $p < 0,05$. Por razones de ética y de costo se utilizó el menor número de animales posible para lograr un resultado estadísticamente representativo del grupo. Estudios previos de este y otros laboratorios han sido capaces de determinar resultados fisiológicos y moleculares válidos y publicables con un n cercano a 5-6 animales por grupo [40-42, 207].

RESULTADOS

Enzimas antioxidantes

Superóxido Dismutasa

Expresión de mRNA

De las isoformas de SOD analizadas se obtuvieron partidores adecuados para SOD2 y SOD3. El análisis arrojó una mayor expresión de SOD2 en pulmones de neonatos de altura tratados con melatonina en comparación a los controles (CN: $1,20 \pm 0,13$ vs MN: $1,71 \pm 0,03$ UA, Figura 4A). La isoforma 3 tuvo similar expresión entre grupos (CN: $0,77 \pm 0,02$ vs MN: $0,80 \pm 0,18$ UA, Figura 4B).

Expresión Proteica

Para el análisis de expresión proteica por Western blot, se obtuvieron sólo anticuerpos funcionales para SOD2 en tejido pulmonar de oveja. Tal como se observa en la Figura 4C, y consistente con la expresión de mRNA, melatonina indujo un aumento significativo en la expresión proteica de SOD2 (mitocondrial) en tejido pulmonar de neonatos de ovejas gestados en altura (CN: $1,53 \pm 0,21$ vs $2,63 \pm 0,38$ UA, Figura 4C).

Actividad enzimática

El análisis de la actividad enzimática de SOD en tejido pulmonar corresponde principalmente a la actividad de SOD intracelular (SOD1 y SOD2). El porcentaje de inhibición por SOD, que equivale a la actividad de esta enzima, fue similar entre los grupos experimentales (CN: $0,85 \pm 0,02$ vs MN: $0,80 \pm 0,02$ U/mL, Figura 4D).

Superóxido dismutasa

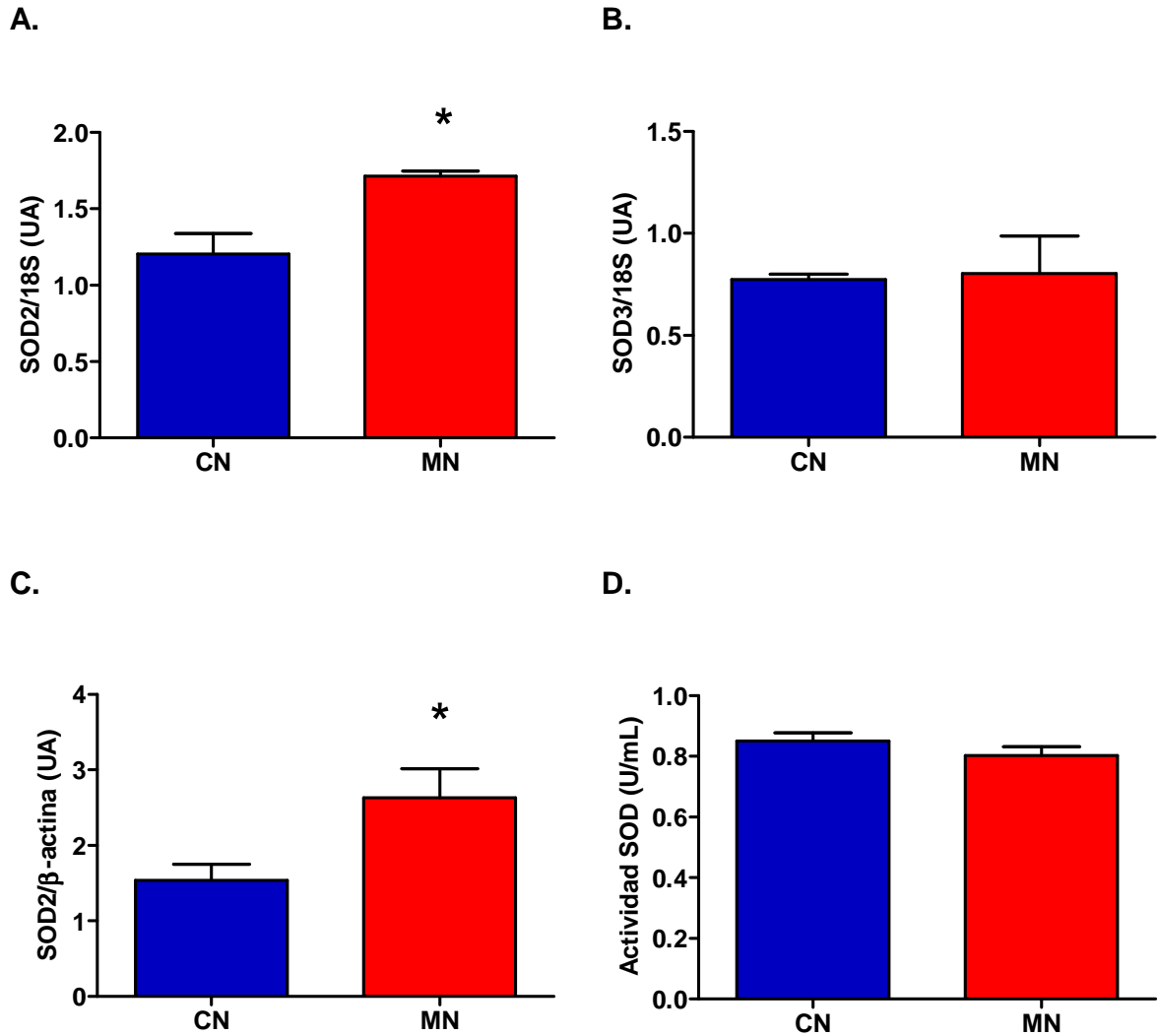


Figura 4. Expresión y actividad de superóxido dismutasa (SOD). Expresión de mRNA para SOD2 (A) y SOD3 (B); Expresión proteica de SOD2 (C) y actividad enzimática de SOD (D) en tejido pulmonar de neonatos del grupo control (CN, ■, n=6) y del grupo tratado con melatonina (MN, ■, n=6). Todos los ensayos se hicieron en triplicado y los resultados son expresados como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p < 0.05$): * vs. CN.

Catalasa

Expresión de mRNA

En la determinación de la expresión de mRNA de CAT a nivel pulmonar se observó un incremento significativo en los neonatos de oveja tratados con melatonina (CN: $1,16 \pm 0,16$ vs MN: $2,29 \pm 0,32$ UA, Figura 5A).

Expresión proteica

La expresión proteica de CAT en tejido pulmonar de neonatos controles y tratados con melatonina fue similar (CN: $2,17 \pm 0,34$ vs MN: $3,25 \pm 0,77$ UA, Figura 5B).

Actividad enzimática

Melatonina efectivamente indujo una mayor actividad enzimática de CAT en tejido pulmonar de neonatos de oveja (CN: $332,9 \pm 24,7$ vs MN: $427,4 \pm 21,7$ U.100 $\mu\text{g}.\text{prot}^{-1}$, Figura 5C).

Catalasa

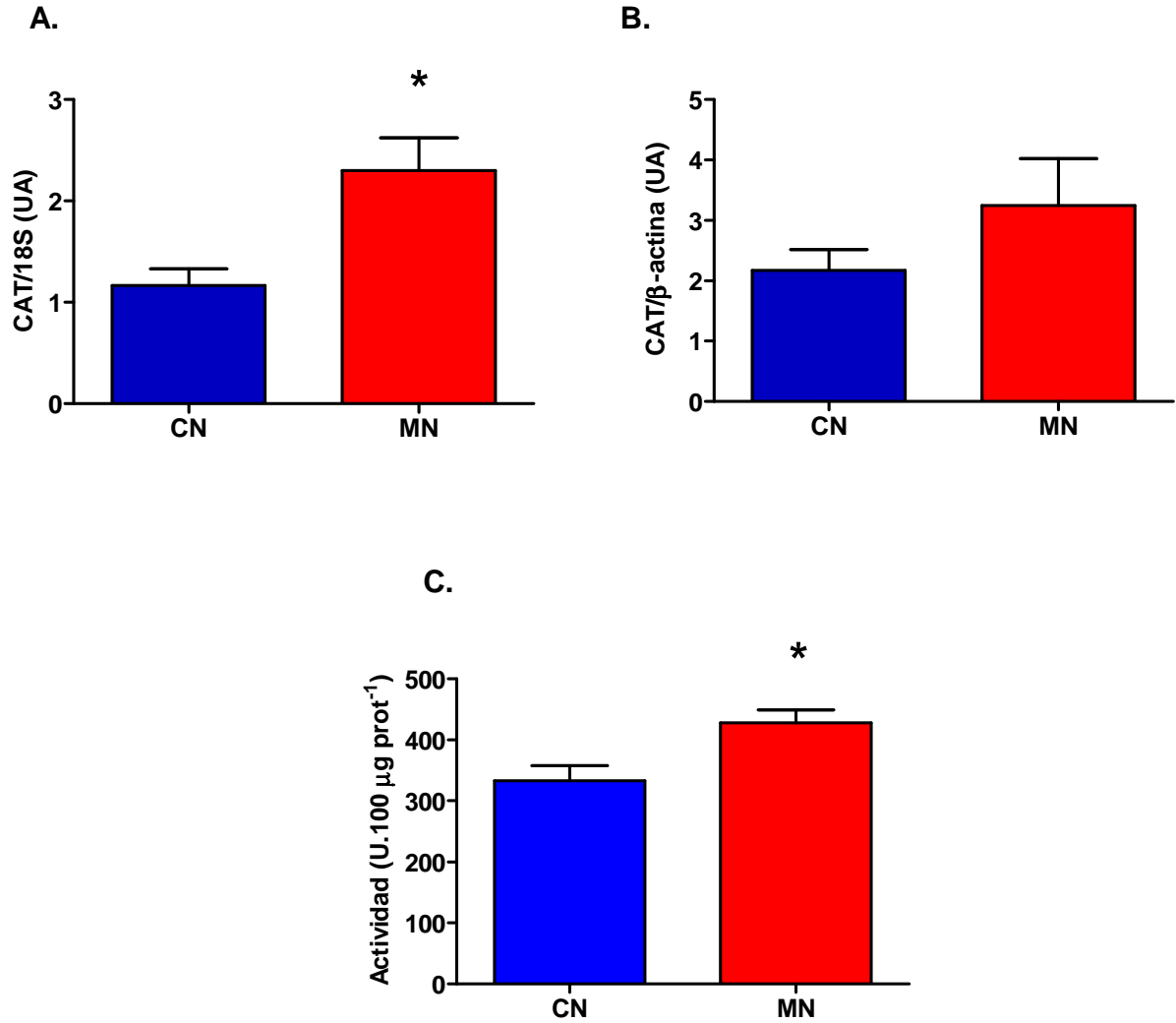


Figura 5. Expresión y actividad de catalasa. Expresión de mRNA (A), expresión proteica (B) y actividad (C) para CAT en tejido pulmonar de neonatos del grupo control (CN, ■, n=6) y del grupo tratado con melatonina (MN, ■, n=6). Todos los ensayos se hicieron en triplicado y los resultados son expresados como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p < 0.05$): * vs. CN.

Glutación peroxidasa

Expresión de mRNA

Se decidió cuantificar el mRNA de GPx1 GPx3 en tejido pulmonar. Gpx1 tuvo similar expresión entre grupos (CN: $1,53 \pm 0,19$ vs MN: $1,92 \pm 0,21$ UA, Figura 6A), mientras que GPx3 tuvo una mayor expresión en los pulmones de neonatos de altura tratados con melatonina (CN: $0,92 \pm 0,15$ vs MN: $1,78 \pm 0,12$ UA, Figura 6B).

Expresión proteica

Sólo se pudo obtener un anticuerpo comercial que funcionara para GPx1 en tejido pulmonar de oveja. La expresión proteica para esta enzima fue similar entre grupos experimentales (CN: $0,89 \pm 0,23$ vs MN: $0,69 \pm 0,14$ UA, Figura 6C).

Actividad enzimática

El análisis de la actividad enzimática de GPx, se realizó en base a la actividad total en tejido pulmonar, la cual fue similar entre los grupos de estudio (CN: $61,64 \pm 12,89$ vs MN: $74,78 \pm 6,52$ U.mg.prot⁻¹, Figura 6D).

Glutación peroxidasa

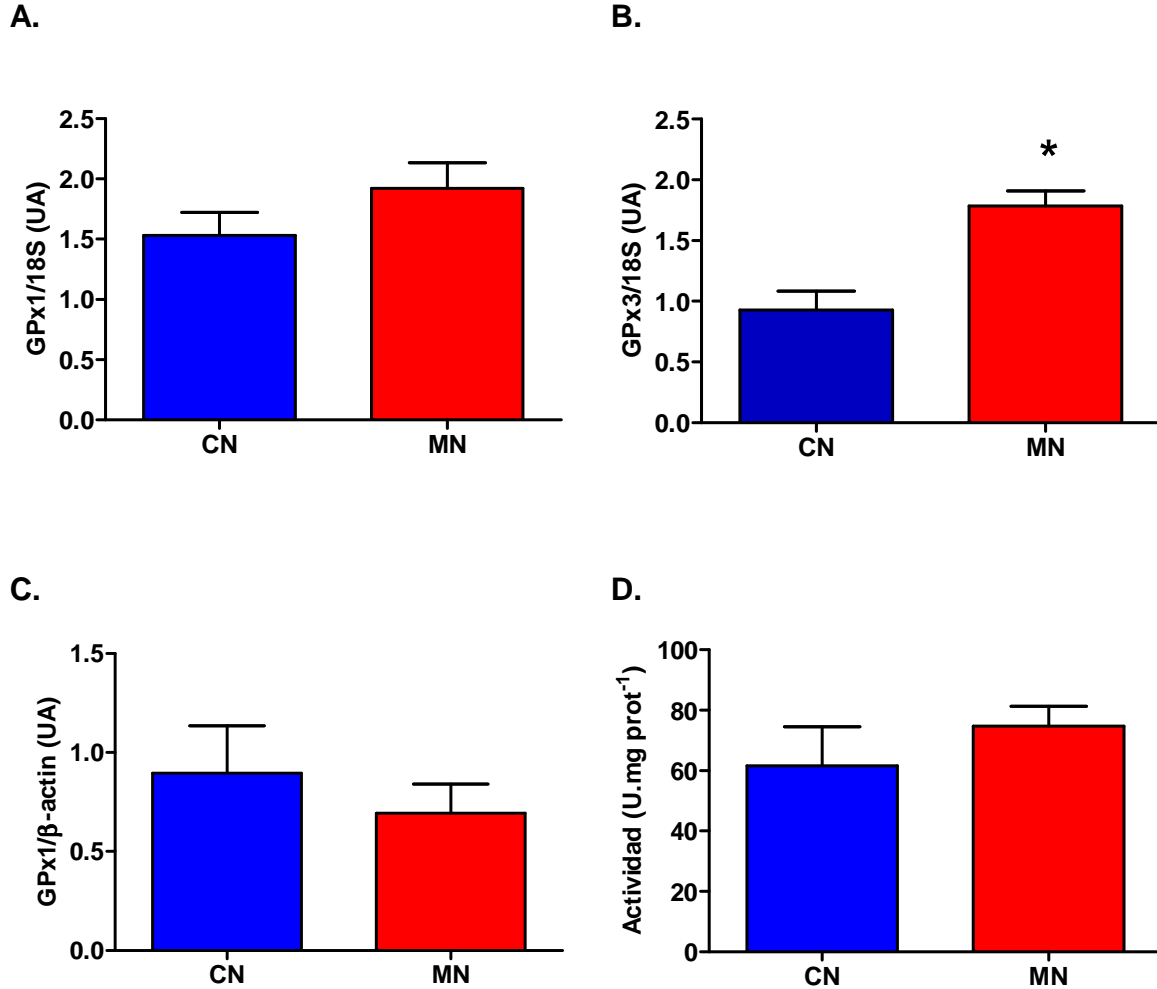


Figura 6. Expresión y actividad de glutación peroxidasa. Expresión de mRNA para GPx1 (A) y GPx3 (B); Expresión proteica de GPx1 (C) y actividad enzimática de GPx (D) en tejido pulmonar de neonatos del grupo control (CN, ■, n=6) y del grupo tratado con melatonina (MN, ■, n=6). Todos los ensayos se hicieron en triplicado y los resultados son expresados como promedio ± ESM. Diferencias significativas ($p < 0.05$): * vs. CN.

Biomarcadores de estrés oxidativo

8-isoprostanos

El resultado de la medición de 8-isoprostanos (8-*iso* Prostaglandin F_{2α}) mostró una tendencia a la disminución de los niveles de este marcador en los animales tratados con melatonina, sin embargo el análisis estadístico arrojó un valor *p* de 0,07 (CN: 55,12 ± 12,68 vs MN: 27,05 ± 4,91 pg/mg prot, Figura 7A).

4-HNE

En el análisis por western blot del hidroperóxido 4-HNE se evidenció una reducción significativa de 4-HNE en tejido pulmonar de neonatos de altura tratados con melatonina (CN: 1,02 ± 0,08 vs MN: 0,74 ± 0,05 UA, Figura 7B).

Ácido úrico

El análisis de este marcador en tejido pulmonar no arrojó diferencias entre neonatos gestados en altura controles y tratados con melatonina (CN: 16,98 ± 1,97 vs MN: 16,91 ± 2,00 mg/ug prot, Figura 7C).

TBARS

La detección de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, en especial malondialdehído (MDA) en tejido pulmonar, fue similar entre los grupos estudiados (CN: 0,37 ± 0,05 vs MN: 0,33 ± 0,05 nM/mg prot, Figura 7D).

Biomarcadores de estrés oxidativo

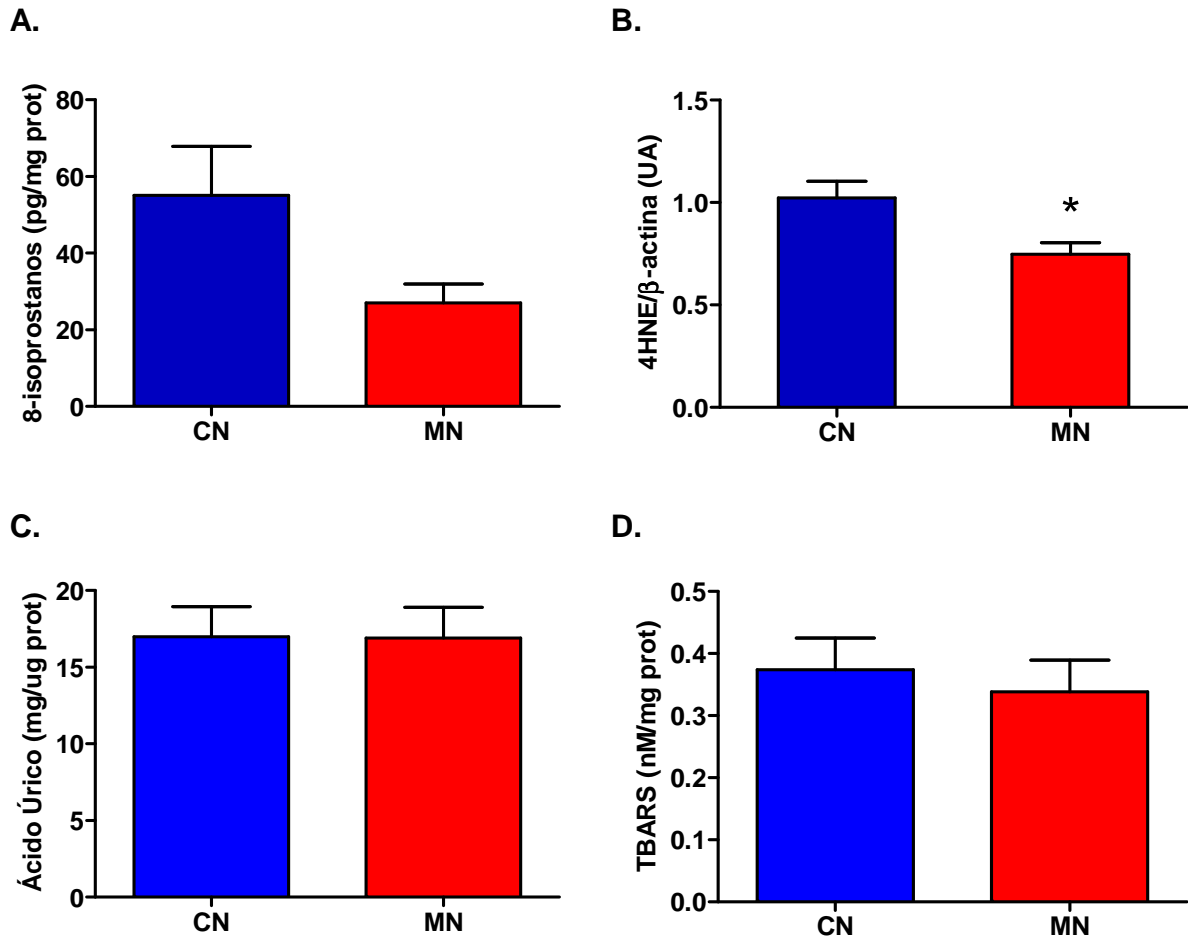


Figura 7. Marcadores de estrés oxidativo pulmonar. Niveles de 8-isoprostanos (A), 4-HNE (B), ácido úrico (C) y TBARS (D) en tejido pulmonar de neonatos del grupo control (CN, ■, n=6) y del grupo tratado con melatonina (MN, ■, n=6). Todos los ensayos se hicieron en triplicado y los resultados son expresados como promedio ± ESM. Diferencias significativas ($p < 0.05$): * vs. CN.

Sensor redox - Nrf2

Los niveles del factor de transcripción sensible a redox Nrf2 en homogenizado total de tejido pulmonar fueron similares entre los grupos de recién nacidos de oveja de altura controles y tratados con melatonina (CN: $0,90 \pm 0,15$ vs MN: $0,89 \pm 0,02$ UA).

Resultados anexos

Bajo el mismo modelo experimental usado en esta tesis, se realizaron estudios en paralelo obteniendo resultados que no son parte de los objetivos de este trabajo, pero ayudan a complementar la relevancia de los datos obtenidos en este estudio.

Variables hemodinámicas

Al nacer, los neonatos de oveja gestados y nacidos en altura presentan valores de PAPm elevados (Figura 8A). Una vez comenzado el tratamiento, los animales que recibieron melatonina presentaron una caída precoz y significativa en el GC, PAPm y RVP (Figura 8) aproximadamente al tercer – cuarto día de vida postnatal. Sin embargo al término del tratamiento los valores se igualaron y no hubo diferencias entre los grupos de estudio.

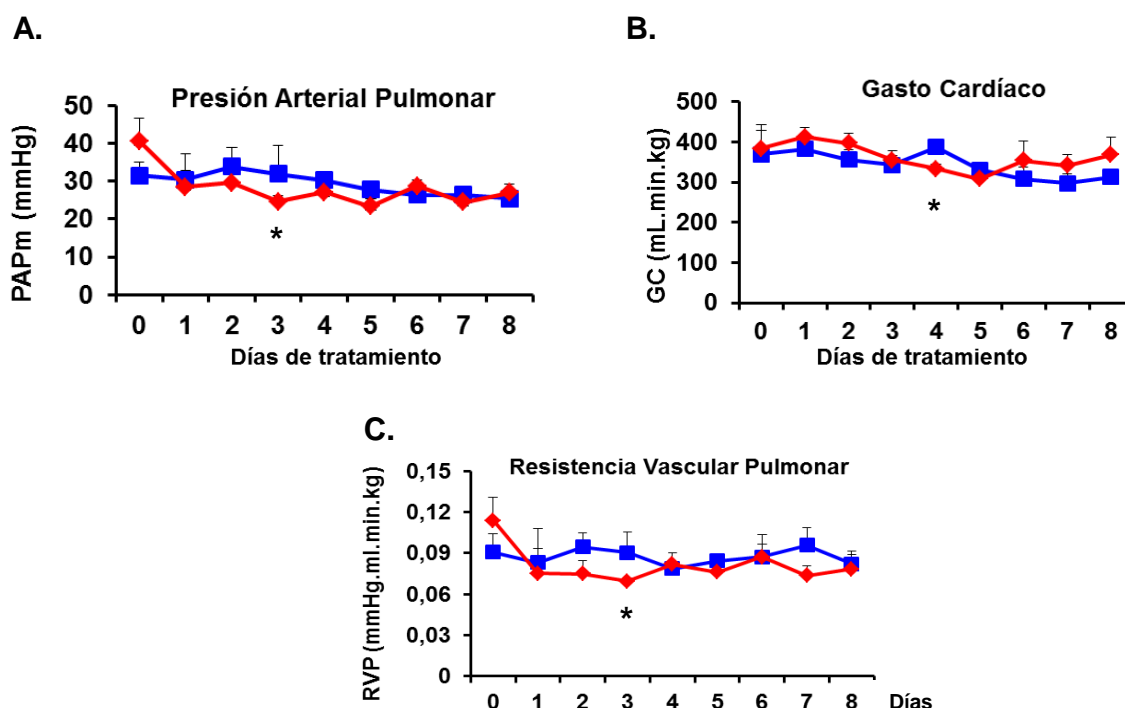


Figura 8. Variables hemodinámicas durante el tratamiento. Presión media de la arteria pulmonar (PAPm, A), gasto cardíaco (GC, B) y resistencia vascular pulmonar (RVP, C) en neonatos del grupo control (CN, ■, n=5) y del grupo tratado con melatonina (MN, ◆, n=6). Los resultados son expresados como promedio ± ESM. Diferencias significativas ($p < 0.05$): * vs. CN.

Vía del óxido nítrico

Se realizaron análisis de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) a nivel de transcrito y proteico en tejido pulmonar, encontrándose niveles similares (Figura 9A y 9B). Sin embargo, en la medición de nitrito/nitratos (NOx) de tejido pulmonar, como productos finales de la vía del NO, hubo un aumento significativo en neonatos de altura tratados con melatonina (CN: $0,07 \pm 0,01$ vs $0,11 \pm 0,01 \mu\text{M}\cdot\text{mg tejido}^{-1}$, Figura 9C).

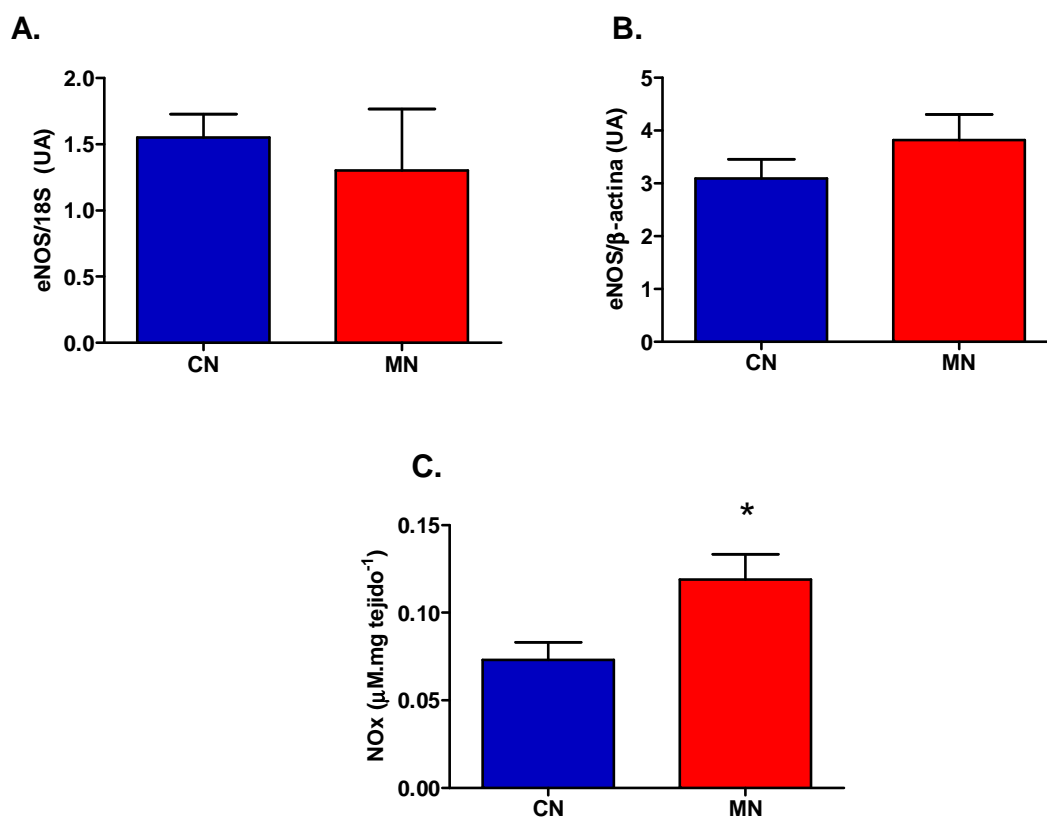


Figura 9. Función y metabolismo del óxido nítrico. Expresión de mRNA (A), expresión proteica (B) de eNOS y niveles de NOx (C) en tejido pulmonar de neonatos del grupo control (CN, ■, n=5) y del grupo tratado con melatonina (MN, ■, n=5). Todos los ensayos se hicieron en triplicado y los resultados son expresados como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p < 0.05$): * vs. CN.

Capacidad reductora del hierro (FRAP)

A través de los catéteres venosos se obtuvieron muestras plasmáticas de todos los neonatos en 3 oportunidades durante el periodo de tratamiento. Esto permitió realizar análisis de la capacidad del plasma para reducir hierro como índice de la capacidad antioxidante. En la figura 10 se observa que para los días 4, 8 y 12 durante el tratamiento, a los animales que se les administró melatonina tuvieron un aumento significativo de la capacidad reductora del plasma (CN: $0,11 \pm 0,02$ vs MN: $0,22 \pm 0,04$ [Fe^{2+}] μM , CN: $0,07 \pm 0,01$ vs MN: $0,24 \pm 0,04$ [Fe^{2+}] μM , CN: $0,07 \pm 0,01$ vs MN: $0,17 \pm 0,03$ [Fe^{2+}] μM , respectivamente).

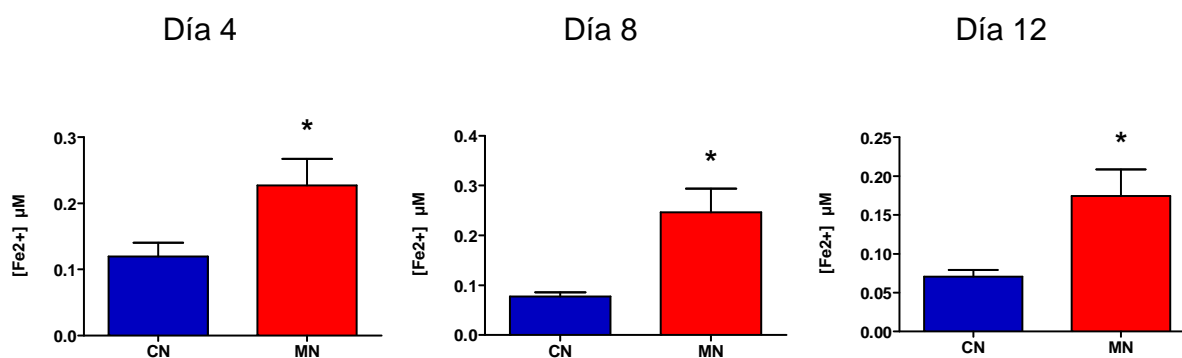


Figura 10. Capacidad reductora del plasma. Capacidad reductora del plasma durante los días 4, 8 y 12 de edad en neonatos del grupo control (CN, ■, n=5) y del grupo tratado con melatonina (MN, ■, n=5). Todos los ensayos se hicieron en triplicado y los resultados son expresados como promedio \pm ESM. Diferencias significativas ($p < 0.05$): * vs. CN.

DISCUSIÓN

El presente trabajo de tesis demostró que melatonina modifica la expresión y actividad de algunas enzimas antioxidantes y disminuye el estrés oxidativo en pulmón de neonatos de oveja con hipertensión pulmonar inducida por hipoxia crónica de altura, efectos que no se habían estudiado hasta ahora en esta patología perinatal. Si bien en el modelo experimental usado en esta tesis no se han realizado estudios comparativos entre el estatus redox sistémico o pulmonar de neonatos de oveja gestados en altura vs neonatos de oveja a nivel de mar, creemos que la evidencia es suficientemente robusta para asegurar el incremento de radicales libres y estrés oxidativo en altura.

Melatonina estimula la expresión y actividad de enzimas antioxidantes en condiciones normales y en estrés oxidativo [190, 191, 193, 213-217]. Además las enzimas antioxidantes también poseen un ciclo circadiano (expresión y actividad) lo que sugiere que podrían estar dependiendo de la señal circadiana concedida por melatonina [218, 219]. En este estudio observamos una mayor actividad de catalasa y mayor expresión de las enzimas SOD2 y GPx3 en los animales tratados con melatonina. Para SOD2, melatonina efectivamente estimuló una mayor expresión del transcrito y la proteína, pero no hubo cambios en la actividad, por lo tanto la acción de melatonina debería estar asociado a cambios post-traduccionales de SOD2, o efectos opuestos en las otras isoformas de SOD, principalmente SOD1, que es la otra enzima involucrada en la actividad total de SOD. Efectivamente hay estudios que demuestran que melatonina se asocia a una disminución en la vida media de CuZn-SOD (SOD1 y SOD3), sin afectar a SOD2, principalmente debido a la generación de un mRNA menos estable [190]. Por lo tanto, los efectos de melatonina de inducción de SOD2 y disminución de SOD1, podrían explicar la similitud en la actividad total encontrada en ambos grupos. Futuros estudios debieran determinar la actividad de las diferentes isoformas de SOD en pulmón de neonatos de altura. Por otro lado, catalasa fue la única enzima que incrementó su actividad con melatonina.

Hubo una mayor expresión del mRNA de catalasa, concordante con estudios publicados [190], y a su vez una mayor actividad, también documentado en pulmón de ratas expuestas a estrés oxidativo [220]. En relación a las isoformas de GPx, no encontramos diferencias en la expresión ni en la actividad de GPx1, a pesar de encontrarse amplia evidencia de su estimulación por melatonina en diversos tejidos [214, 221-224]. De hecho, sólo encontramos mayor expresión de mRNA para GPx3, pero esto no se reflejó en cambios en la actividad total de GPx. Desafortunadamente, solo pudimos establecer un protocolo para determinar expresión proteica para GPx1, por lo que queda abierta la pregunta si efectivamente el aumento del transcrito de GPx3 se traduce en una mayor expresión y actividad específica de esta enzima.

La regulación de enzimas antioxidantes por melatonina estaría relacionada a la activación de receptores de melatonina (MT1 y MT2) y mediada por segundos mensajeros como cAMP, fosfolipasa C y/o niveles de Ca²⁺ intracelular [190, 214]. Además, la unión de melatonina a su receptor podría activar una cascada de MAP kinasas y estimular factores de transcripción [225]. También se ha visto relacionada la regulación de enzimas antioxidantes por melatonina a la vía de señalización calcio/calmodulina, ya sea a través de la unión a sus receptores MT1/MT2 o uniéndose directamente a calmodulina [185, 226]. Además melatonina regula factores de transcripción como NFkB y AP-1, los cuales también están relacionados a la región promotora de las 3 enzimas antioxidantes [227-229]. Todo lo anterior apunta a que estos mecanismos podrían ser los responsables de los aumentos de mRNA de las enzimas antioxidantes observados en nuestro modelo tratado con melatonina. A la vez, tampoco se puede descartar la acción indirecta de melatonina en la regulación enzimática, disminuyendo el estrés oxidativo por su acción *scavenger* directa de radicales libres. Esto, teóricamente disminuiría el estímulo oxidativo inductor de las enzimas. Por lo tanto, la regulación de la expresión de las enzimas antioxidantes por melatonina podría ser modulada por efectos receptor-dependientes e independientes. Esto demuestra que la regulación de las enzimas antioxidantes por melatonina comprende acciones complejas tanto de forma directa como indirecta y en diferentes niveles de la síntesis y expresión proteica.

De los 4 marcadores de estrés oxidativo analizados, sólo la medición de 4-HNE mostró una disminución significativa que refleja un menor daño lipídico por estrés oxidativo en los neonatos tratados con melatonina.

La medición de 8-isoprostanos mostró una clara tendencia a la disminución de este marcador en los animales tratados con melatonina que mediante su análisis estadístico con la prueba t-test arrojó un valor de p cercano a 0,05 ($p=0,07$). Por medio del cálculo del tamaño de "n" para dos muestras se concluyó necesario agregar 2 animales más por grupo para obtener diferencias significativas en este marcador.

Si bien los marcadores de estrés oxidativo 8-isoprostanos y 4-HNE son productos finales de lipoperoxidación, también son considerados mediadores de daño oxidativo [127, 230]. El más estudiado por su alta reactividad con otros elementos es el 4-HNE. Proteínas y péptidos son el grupo más importante como blanco para el 4-HNE, alterando su función [231], lo cual podría explicar en parte la disfunción endotelial pulmonar observada en estudios previos [232]. De hecho, en ese mismo trabajo se describe que melatonina fue parcialmente capaz de recuperar la función endotelial. 4-HNE posee una fuerte afinidad por el glutatión reducido (GSH) y la glutatión peroxidasa (GPx) con la cual cuando existe un exceso de 4-HNE, se forman aductos que son más susceptibles a la degradación vía proteosomas [233], disminuyendo la biodisponibilidad de estos elementos antioxidantes. No hay estudios que demuestren un efecto directo de melatonina sobre 4-HNE, por lo tanto deducimos que esta disminución estaría mediada por el efecto antioxidante de melatonina en la reducción del estrés oxidativo y menor lipoperoxidación.

El producto de degradación de las purinas, ácido úrico, refleja la actividad de la enzima xantina oxidasa. Aún no está claro cómo melatonina podría regular la xantina oxidasa. Hay estudios que demuestran un efecto inhibitorio de melatonina en XO principalmente en cardiomiocitos [234], cerebro [235, 236] e hígado [237]. Inferimos que en nuestro modelo, melatonina no estaría ejerciendo acciones inhibitorias en la

XO a nivel pulmonar, ya que nuestros hallazgos no demuestran diferencias en los niveles de ácido úrico entre grupos. Las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) es un marcador de daño oxidativo a lípidos, ampliamente usado debido a su bajo costo, fácil y rápida aplicación en fluidos corporales y tejidos. Sin embargo también es amplia la crítica en relación a su poca especificidad y tendencia a arrojar artefactos [177, 238, 239], por lo tanto, el no haber encontrado diferencias en este marcador en nuestro estudio, no es indicador de que melatonina no pueda estar reduciendo el estrés oxidativo a nivel pulmonar en este modelo experimental.

En consecuencia, los marcadores que dieron mayores diferencias son los más específicos y sensibles para determinar estrés oxidativo, con lo que concluimos que melatonina está efectivamente actuando como antioxidante pulmonar en los recién nacidos de altura.

Nrf2 es un factor de transcripción que constitutivamente se está degradando a nivel citosólico y cuando existe estrés oxidativo, éste deja de degradarse y permite que mayor cantidad se acumule en núcleo permitiendo la transcripción de elementos de respuesta antioxidantes. En contraste con el grado de estrés oxidativo observado en nuestro modelo, los niveles del sensor redox Nrf2, en tejido total pulmonar, fueron similares en los grupos estudiados. Si bien Nrf2 se ha visto activado en hipoxia crónica de altura a nivel cerebral [143], no hay datos de su activación e nivel pulmonar en relación a la hipoxia hipobárica de altura. Una posible explicación para nuestros resultados podría estar dada por un nivel de estrés oxidativo insuficiente a nivel pulmonar para lograr activar a Nrf2 y observar diferencias. Sin embargo, existen datos en la literatura en relación a la disminución de expresión de Nrf2 mediada por HIF-1 [240], por lo que en condiciones de hipoxia este hecho estaría manifiesto, con menores niveles de Nrf2, lo que podría haber impedido observar grandes diferencias entre nuestros grupos de estudio. Teniendo presente que el uso de pulmón completo tiene poca especificidad del tipo celular, el mismo análisis de Nrf2 en tejido vascular u otro tipo de análisis como un Western blot diferencial núcleo/citosol, análisis inmunohistoquímico, o un EMSA que permite detectar interacciones proteína-DNA, podría arrojar diferencias entre grupos. Alternativamente, se podría evaluar algunos

de los genes regulados por Nrf2, como Hemoxigenasa-1 o NAD(P)H quinona oxidoreductasa-1, para ver la consistencia de este resultado.

Finalmente los análisis anexos a este trabajo, como las variables hemodinámicas, indican que el tratamiento con melatonina no se estaría traduciendo en cambios clínicos relevantes. Sin embargo los resultados en la mejora de la capacidad antioxidante y reducción en el estrés oxidativo de este trabajo, sumado a mayores niveles de FRAP como indicador de un mayor poder reductor del plasma en animales tratados con melatonina, se traducen en una mayor biodisponibilidad de NO, como se evidencia en los mayores niveles de NOx en pulmón de neonatos tratados con melatonina. Es más, en experimentos realizados en estos mismos animales en arterias pulmonares de resistencia mediante miografía, se ha observado una mejora en la función endotelial y la relajación mediada por NO [232].

En resumen, este estudio demuestra por primera vez un incremento funcional y efectivo en la capacidad antioxidante y reducción del estrés oxidativo mediado por melatonina en el neonato de oveja gestado y nacido en altura. Melatonina ya ha demostrado ser útil y seguro en patologías perinatales [241-244]. Actualmente melatonina es un antioxidante aprobado por la FDA como potencial terapia neuroprotectora efectiva en neonatos [245] debido a sus características farmacodinámicas como el cruzar fácilmente las barreras biológicas [246, 247], buena absorción por vía oral [248] y amplio rango de seguridad [203].

Evidentemente la hipertensión pulmonar neonatal es una patología multifactorial, lo que podría respaldar la ausencia de cambios hemodinámicos presentados en este trabajo en los animales tratados con melatonina. Se debe tener en cuenta además que existe una ausencia fisiológica de melatonina los primeros días de vida [187], cuyo rol es desconocido, pero se presume que no es necesaria en condiciones normales. Al respecto, la administración precoz de melatonina en nuestro modelo experimental no se tradujo en algún efecto adverso evidente. Probablemente una posterior maduración del sistema pineal y receptores a nivel periférico permitan evidenciar mayores efectos si melatonina se administra más tarde

en la vida postnatal. Aun así, los resultados positivos encontrados en este estudio nos permiten plantear alternativas de estudio experimental a futuro como un aumento en la dosis y/o en el periodo de administración de melatonina, o complementar su acción con otros agentes vasodilatadores usados en la hipertensión pulmonar neonatal como el sildenafil, iloprost o bosentán. Como esta es una patología multifactorial y compleja, es lógico pensar en una asociación de medicamentos como tratamiento dirigido a mejorar la función vascular pulmonar. Por lo tanto, a nuestro entender, una asociación de agentes antioxidantes, vasodilatadores y antirremodelantes vasculares debieran aumentar la efectividad de los tratamientos para combatir la hipertensión pulmonar neonatal de altura.

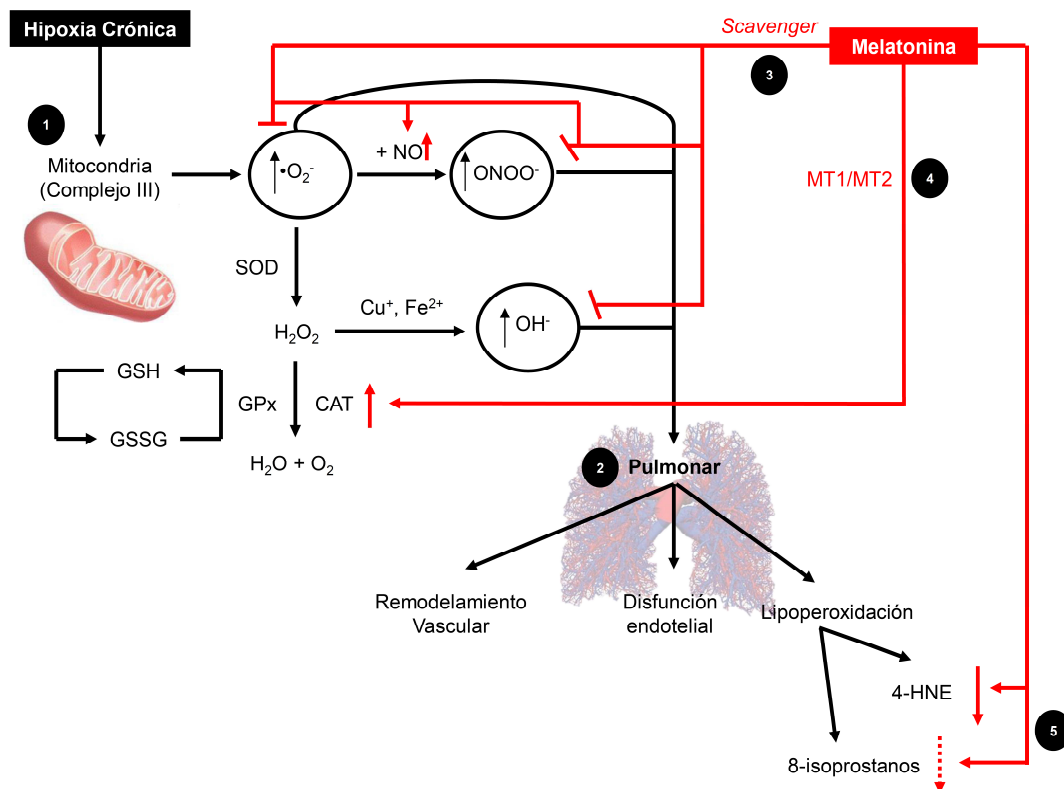


Figura 11. Origen de ROS y efectos de melatonina a nivel pulmonar. (1) La hipoxia a nivel mitocondrial induciría la generación de ROS. (2) ROS a nivel pulmonar mediarían efectos remodelantes de la vasculatura, disfunción endotelial y lipoperoxidación. (3) Melatonina mediante su acción *scavenger*, reclutaría radicales libres y aumentaría la disponibilidad de NO. (4) Melatonina aumentaría la actividad de catalasa, efecto probablemente mediado por sus receptores de membrana MT1/MT2. (5) Disminución de marcadores de lipoperoxidación (flecha punteada indica tendencia según lo encontrado en este estudio).

Conclusión

Este estudio demostró que melatonina es un buen antioxidante a nivel pulmonar en neonatos de oveja gestados y nacidos en hipoxia crónica. Esperamos que los resultados positivos encontrados en este trabajo de tesis deriven en futuros estudios en el área. Sin duda que un mayor y acabado conocimiento de la fisiopatología de la hipertensión pulmonar neonatal mejorará el enfrentamiento terapéutico tradicional, que actualmente por su escasa efectividad, deja en deuda a una gran cantidad de recién nacidos que padecen esta patología.

BIBLIOGRAFÍA

1. Moore, L.G.; Niermeyer, S. and Zamudio, S. "Human adaptation to high altitude: regional and life-cycle perspectives". *Am J Phys Anthropol. Suppl* 27: 25-64, 1998.
2. Xu, X.Q. and Jing, Z.C. "High-altitude pulmonary hypertension". *Eur Respir Rev.* 18(111): 13-17, 2009.
3. Penalzoza, D. "Effects of high-altitude exposure on the pulmonary circulation". *Rev Esp Cardiol (Engl Ed).* 65(12): 1075-1078, 2012.
4. Beall, C.M. "Andean, Tibetan, and Ethiopian patterns of adaptation to high-altitude hypoxia". *Integr Comp Biol.* 46(1): 18-24, 2006.
5. Storz, J.F. and Moriyama, H. "Mechanisms of hemoglobin adaptation to high altitude hypoxia". *High Alt Med Biol.* 9(2): 148-157, 2008.
6. Penalzoza, D. and Arias-Stella, J. "The heart and pulmonary circulation at high altitudes: healthy highlanders and chronic mountain sickness". *Circulation.* 115(9): 1132-1146, 2007.
7. Montani, D.; Gunther, S.; Dorfmüller, P.; Perros, F.; Girerd, B.; Garcia, G.; Jais, X.; Savale, L.; Artaud-Macari, E.; Price, L.C.; Humbert, M.; Simonneau, G. and Sitbon, O. "Pulmonary arterial hypertension". *Orphanet J Rare Dis.* 8(1): 97, 2013.
8. Peñaloza, D.; Sime, F.; Banchemo, N.; Gamboa, R.; Cruz, J. and Marticorena, E. "Pulmonary hypertension in healthy men born and living at high altitudes". *The American journal of cardiology.* 11(2): 150-157, 1963.
9. Ordonez, J.H. "Physiological observations in residents of Bogota, Colombia, altitude 8700 feet". *Rocky Mt Med J.* 66(4): 33-36, 1969.
10. Hultgren, H.; Kelly, J. and Miller, H. "Pulmonary circulation in acclimatized man at high altitude". *Journal of Applied Physiology.* 20(2): 233-238, 1965.
11. Yang, Z.; He, Z.Q. and Liu, X.L. "[Pulmonary hypertension related to high altitude: analysis of 83 cases with microcatheterization]". *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi.* 13(1): 32-34, 77, 1985.
12. Penalzoza, D. and Sime, F. "Chronic cor pulmonale due to loss of altitude acclimatization (chronic mountain sickness)". *Am J Med.* 50(6): 728-743, 1971.
13. Groves, B.M.; Droma, T.; Sutton, J.R.; McCullough, R.G.; McCullough, R.E.; Zhuang, J.; Rapmund, G.; Sun, S.; Janes, C. and Moore, L.G. "Minimal hypoxic pulmonary hypertension in normal Tibetans at 3,658 m". *J Appl Physiol* (1985). 74(1): 312-318, 1993.
14. Maggiorini, M. and Leon-Velarde, F. "High-altitude pulmonary hypertension: a pathophysiological entity to different diseases". *European Respiratory Journal.* 22(6): 1019-1025, 2003.
15. Hakim, T.S.; Michel, R.P.; Minami, H. and Chang, H.K. "Site of pulmonary hypoxic vasoconstriction studied with arterial and venous occlusion". *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 54(5): 1298-1302, 1983.
16. Audi, S.H.; Dawson, C.A.; Rickaby, D.A. and Linehan, J.H. "Localization of the sites of pulmonary vasomotion by use of arterial and venous occlusion". *J Appl Physiol* (1985). 70(5): 2126-2136, 1991.
17. Sylvester, J.T.; Shimoda, L.A.; Aaronson, P.I. and Ward, J.P. "Hypoxic pulmonary vasoconstriction". *Physiol Rev.* 92(1): 367-520, 2012.
18. Durmowicz, A.G.; Hofmeister, S.; Kadyraliev, T.K.; Aldashev, A.A. and Stenmark, K.R. "Functional and structural adaptation of the yak pulmonary circulation to residence at high altitude". *J Appl Physiol* (1985). 74(5): 2276-2285, 1993.
19. Waypa, G.B. and Schumacker, P.T. "Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing". *J Appl Physiol* (1985). 98(1): 404-414, 2005.
20. Moudgil, R.; Michelakis, E.D. and Archer, S.L. "Hypoxic pulmonary vasoconstriction". *J Appl Physiol* (1985). 98(1): 390-403, 2005.
21. Raj, U. and Shimoda, L. "Oxygen-dependent signaling in pulmonary vascular smooth muscle". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 283(4): L671-677, 2002.

22. Gupta, M.L.; Rao, K.S.; Anand, I.S.; Banerjee, A.K. and Boparai, M.S. "Lack of smooth muscle in the small pulmonary arteries of the native Ladakhi. Is the Himalayan highlander adapted?". *Am Rev Respir Dis.* 145(5): 1201-1204, 1992.
23. Harris, P.; Heath, D.; Smith, P.; Williams, D.R.; Ramirez, A.; Kruger, H. and Jones, D.M. "Pulmonary circulation of the llama at high and low altitudes". *Thorax.* 37(1): 38-45, 1982.
24. Llanos, A.J.; Ebensperger, G.; Herrera, E.A.; Reyes, R.V.; Cabello, G.; Diaz, M.; Giussani, D.A. and Parer, J.T. "The heme oxygenase-carbon monoxide system in the regulation of cardiorespiratory function at high altitude". *Respir Physiol Neurobiol.* 184(2): 186-191, 2012.
25. Abman, S.H. "Abnormal vasoreactivity in the pathophysiology of persistent pulmonary hypertension of the newborn". *Pediatr Rev.* 20(11): e103-109, 1999.
26. Gao, Y. and Raj, J.U. "Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn". *Physiol Rev.* 90(4): 1291-1335, 2010.
27. Kiserud, T. "Physiology of the fetal circulation". *Semin Fetal Neonatal Med.* 10(6): 493-503, 2005.
28. Niermeyer, S. "Going to high altitude with a newborn infant". *High Alt Med Biol.* 8(2): 117-123, 2007.
29. Gamboa, R. and Marticorena, E. "[Pulmonary arterial pressure in newborn infants in high altitude]". *Arch Inst Biol Andina.* 4(2): 55-66, 1971.
30. Sime, F.; Banchemo, N.; Penalzoza, D.; Gamboa, R.; Cruz, J. and Marticorena, E. "Pulmonary hypertension in children born and living at high altitudes". *Am J Cardiol.* 11: 143-149, 1963.
31. Keyes, L.E.; Armaza, J.F.; Niermeyer, S.; Vargas, E.; Young, D.A. and Moore, L.G. "Intrauterine growth restriction, preeclampsia, and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia". *Pediatr Res.* 54(1): 20-25, 2003.
32. Walsh-Sukys, M.C.; Tyson, J.E.; Wright, L.L.; Bauer, C.R.; Korones, S.B.; Stevenson, D.K.; Verter, J.; Stoll, B.J.; Lemons, J.A.; Papile, L.A.; Shankaran, S.; Donovan, E.F.; Oh, W.; Ehrenkranz, R.A. and Fanaroff, A.A. "Persistent pulmonary hypertension of the newborn in the era before nitric oxide: practice variation and outcomes". *Pediatrics.* 105(1 Pt 1): 14-20, 2000.
33. Abman, S.H. "Recent advances in the pathogenesis and treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn". *Neonatology.* 91(4): 283-290, 2007.
34. Haworth, S.G. and Hislop, A.A. "Lung development—the effects of chronic hypoxia". *Seminars in Neonatology.* 8(1): 1-8, 2003.
35. Stenmark, K.R.; Fagan, K.A. and Frid, M.G. "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms". *Circ Res.* 99(7): 675-691, 2006.
36. Gao, Y. and Raj, J.U. "Hypoxic pulmonary hypertension of the newborn". *Compr Physiol.* 1(1): 61-79, 2011.
37. Steinhorn, R.H. "Neonatal pulmonary hypertension". *Pediatr Crit Care Med.* 11(2 Suppl): S79-84, 2010.
38. Konduri, G.G.; Solimano, A.; Sokol, G.M.; Singer, J.; Ehrenkranz, R.A.; Singhal, N.; Wright, L.L.; Van Meurs, K.; Stork, E.; Kirpalani, H. and Peliowski, A. "A randomized trial of early versus standard inhaled nitric oxide therapy in term and near-term newborn infants with hypoxic respiratory failure". *Pediatrics.* 113(3 Pt 1): 559-564, 2004.
39. Steinhorn, R.H. "Pharmacotherapy for pulmonary hypertension". *Pediatr Clin North Am.* 59(5): 1129-1146, 2012.
40. Herrera, E.A.; Ebensperger, G.; Krause, B.J.; Riquelme, R.A.; Reyes, R.V.; Capetillo, M.; Gonzalez, S.; Parer, J.T. and Llanos, A.J. "Sildenafil reverses hypoxic pulmonary hypertension in highland and lowland newborn sheep". *Pediatr Res.* 63(2): 169-175, 2008.
41. Herrera, E.A.; Pulgar, V.M.; Riquelme, R.A.; Sanhueza, E.M.; Reyes, R.V.; Ebensperger, G.; Parer, J.T.; Valdez, E.A.; Giussani, D.A.; Blanco, C.E.; Hanson, M.A. and Llanos, A.J. "High-altitude chronic hypoxia during gestation and after birth modifies cardiovascular responses in newborn sheep". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 292(6): R2234-2240, 2007.
42. Herrera, E.A.; Riquelme, R.A.; Ebensperger, G.; Reyes, R.V.; Ulloa, C.E.; Cabello, G.; Krause, B.J.; Parer, J.T.; Giussani, D.A. and Llanos, A.J. "Long-term exposure to high-altitude chronic hypoxia during gestation induces neonatal pulmonary hypertension at sea level". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 299(6): R1676-1684, 2010.

43. Parrau, D.; Ebensperger, G.; Herrera, E.A.; Moraga, F.; Riquelme, R.A.; Ulloa, C.E.; Rojas, R.T.; Silva, P.; Hernandez, I.; Ferrada, J.; Diaz, M.; Parer, J.T.; Cabello, G.; Llanos, A.J. and Reyes, R.V. "Store-operated channels in the pulmonary circulation of high- and low-altitude neonatal lambs". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 304(8): L540-548, 2013.
44. Moraga, F.A.; Reyes, R.V.; Herrera, E.A.; Riquelme, R.A.; Ebensperger, G.; Pulgar, V.M.; Parer, J.T.; Giussani, D.A. and Llanos, A.J. "Role of the alpha-adrenergic system in femoral vascular reactivity in neonatal llamas and sheep: a comparative study between highland and lowland species". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 301(4): R1153-1160, 2011.
45. Llanos, A.J.; Ebensperger, G.; Herrera, E.A.; Reyes, R.V.; Pulgar, V.M.; Seron-Ferre, M.; Diaz, M.; Parer, J.T.; Giussani, D.A.; Moraga, F.A. and Riquelme, R.A. "Fetal and postnatal pulmonary circulation in the Alto Andino". *Placenta.* 32 Suppl 2: S100-103, 2011.
46. Thannickal, V.J. and Fanburg, B.L. "Reactive oxygen species in cell signaling". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 279(6): L1005-1028, 2000.
47. Bergendi, L.; Benes, L.; Durackova, Z. and Ferencik, M. "Chemistry, physiology and pathology of free radicals". *Life Sci.* 65(18-19): 1865-1874, 1999.
48. Sies, H. "Oxidative stress: oxidants and antioxidants". *Exp Physiol.* 82(2): 291-295, 1997.
49. Gechev, T.; Gadjev, I.; Van Breusegem, F.; Inze, D.; Dukjandjiev, S.; Toneva, V. and Minkov, I. "Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes". *Cell Mol Life Sci.* 59(4): 708-714, 2002.
50. Jialal, I. "Antioxidants and Atherosclerosis: Don't Throw Out the Baby With the Bath Water". *Circulation.* 107(7): 926-928, 2003.
51. Guzik, T.J. "Mechanisms of Increased Vascular Superoxide Production in Human Diabetes Mellitus: Role of NAD(P)H Oxidase and Endothelial Nitric Oxide Synthase". *Circulation.* 105(14): 1656-1662, 2002.
52. Berlett, B.S. "Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress". *Journal of Biological Chemistry.* 272(33): 20313-20316, 1997.
53. Lin, M.T. and Beal, M.F. "Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases". *Nature.* 443(7113): 787-795, 2006.
54. Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M. and Mazur, M. "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer". *Chem Biol Interact.* 160(1): 1-40, 2006.
55. Rahman, I.; Skwarska, E.; Henry, M.; Davis, M.; O'Connor, C.M.; FitzGerald, M.X.; Greening, A. and MacNee, W. "Systemic and pulmonary oxidative stress in idiopathic pulmonary fibrosis". *Free Radic Biol Med.* 27(1-2): 60-68, 1999.
56. Pechanova, O. and Simko, F. "The role of nitric oxide in the maintenance of vasoactive balance". *Physiol Res.* 56 Suppl 2: S7-S16, 2007.
57. Apel, K. and Hirt, H. "Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction". *Annu Rev Plant Biol.* 55: 373-399, 2004.
58. Wilcox, C.S.; Welch, W.J.; Murad, F.; Gross, S.S.; Taylor, G.; Levi, R. and Schmidt, H.H. "Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(24): 11993-11997, 1992.
59. MacMicking, J.D.; Nathan, C.; Hom, G.; Chartrain, N.; Fletcher, D.S.; Trumbauer, M.; Stevens, K.; Xie, Q.W.; Sokol, K.; Hutchinson, N. and et al. "Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase". *Cell.* 81(4): 641-650, 1995.
60. Mruk, D.D.; Silvestrini, B.; Mo, M.Y. and Cheng, C.Y. "Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility". *Contraception.* 65(4): 305-311, 2002.
61. Crapo, J.D.; Oury, T.; Rabouille, C.; Slot, J.W. and Chang, L.Y. "Copper,zinc superoxide dismutase is primarily a cytosolic protein in human cells". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(21): 10405-10409, 1992.
62. Liou, W.; Chang, L.Y.; Geuze, H.J.; Strous, G.J.; Crapo, J.D. and Slot, J.W. "Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver". *Free Radic Biol Med.* 14(2): 201-207, 1993.
63. Dimmeler, S.; Hermann, C.; Galle, J. and Zeiher, A.M. "Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19(3): 656-664, 1999.

64. Isoherranen, K.; Peltola, V.; Laurikainen, L.; Punnonen, J.; Laihia, J.; Ahotupa, M. and Punnonen, K. "Regulation of copper/zinc and manganese superoxide dismutase by UVB irradiation, oxidative stress and cytokines". *J Photochem Photobiol B.* 40(3): 288-293, 1997.
65. Yoo, H.Y.; Chang, M.S. and Rho, H.M. "Heavy metal-mediated activation of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene via a metal-responsive element". *Mol Gen Genet.* 262(2): 310-313, 1999.
66. Yoo, H.Y.; Chang, M.S. and Rho, H.M. "The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element". *J Biol Chem.* 274(34): 23887-23892, 1999.
67. Rahman, I.; Clerch, L.B. and Massaro, D. "Rat lung antioxidant enzyme induction by ozone". *Am J Physiol.* 260(6 Pt 1): L412-418, 1991.
68. Frank, S.; Kampfer, H.; Podda, M.; Kaufmann, R. and Pfeilschifter, J. "Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation". *Biochem J.* 346 Pt 3: 719-728, 2000.
69. Yoo, H.Y.; Chang, M.S. and Rho, H.M. "Induction of the rat Cu/Zn superoxide dismutase gene through the peroxisome proliferator-responsive element by arachidonic acid". *Gene.* 234(1): 87-91, 1999.
70. Jackson, R.M.; Parish, G. and Ho, Y.S. "Effects of hypoxia on expression of superoxide dismutases in cultured ATII cells and lung fibroblasts". *Am J Physiol.* 271(6 Pt 1): L955-962, 1996.
71. Marklund, S.L. "Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79(24): 7634-7638, 1982.
72. Nozik-Grayck, E.; Suliman, H.B. and Piantadosi, C.A. "Extracellular superoxide dismutase". *Int J Biochem Cell Biol.* 37(12): 2466-2471, 2005.
73. Folz, R.J.; Guan, J.; Seldin, M.F.; Oury, T.D.; Enghild, J.J. and Crapo, J.D. "Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization, and lung in situ hybridization". *Am J Respir Cell Mol Biol.* 17(4): 393-403, 1997.
74. Stralin, P.; Karlsson, K.; Johansson, B.O. and Marklund, S.L. "The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 15(11): 2032-2036, 1995.
75. Loenders, B.; Van Mechelen, E.; Nicolai, S.; Buysens, N.; Van Osselaer, N.; Jorens, P.G.; Willems, J.; Herman, A.G. and Slegers, H. "Localization of extracellular superoxide dismutase in rat lung: neutrophils and macrophages as carriers of the enzyme". *Free Radic Biol Med.* 24(7-8): 1097-1106, 1998.
76. Brady, T.C.; Chang, L.Y.; Day, B.J. and Crapo, J.D. "Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation". *Am J Physiol.* 273(5 Pt 1): L1002-1006, 1997.
77. Stralin, P. and Marklund, S.L. "Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression". *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281(4): H1621-1629, 2001.
78. Weisiger, R.A. and Fridovich, I. "Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization". *J Biol Chem.* 248(13): 4793-4796, 1973.
79. St Clair, D.K.; Oberley, T.D.; Muse, K.E. and St Clair, W.H. "Expression of manganese superoxide dismutase promotes cellular differentiation". *Free Radic Biol Med.* 16(2): 275-282, 1994.
80. Wispe, J.R.; Warner, B.B.; Clark, J.C.; Dey, C.R.; Neuman, J.; Glasser, S.W.; Crapo, J.D.; Chang, L.Y. and Whitsett, J.A. "Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury". *J Biol Chem.* 267(33): 23937-23941, 1992.
81. Masuda, A.; Longo, D.L.; Kobayashi, Y.; Appella, E.; Oppenheim, J.J. and Matsushima, K. "Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase by interleukin 1". *FASEB J.* 2(15): 3087-3091, 1988.

82. Karube-Harada, A.; Sugino, N.; Kashida, S.; Takiguchi, S.; Takayama, H.; Yamagata, Y.; Nakamura, Y. and Kato, H. "Induction of manganese superoxide dismutase by tumour necrosis factor-alpha in human endometrial stromal cells". *Mol Hum Reprod.* 7(11): 1065-1072, 2001.
83. Visner, G.A.; Dougall, W.C.; Wilson, J.M.; Burr, I.A. and Nick, H.S. "Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. Role in the acute inflammatory response". *J Biol Chem.* 265(5): 2856-2864, 1990.
84. Harris, C.A.; Derbin, K.S.; Hunte-McDonough, B.; Krauss, M.R.; Chen, K.T.; Smith, D.M. and Epstein, L.B. "Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1". *J Immunol.* 147(1): 149-154, 1991.
85. Zhu, C.H.; Huang, Y.; Oberley, L.W. and Domann, F.E. "A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression". *J Biol Chem.* 276(17): 14407-14413, 2001.
86. Chung, D.J.; Wright, A.E. and Clerch, L.B. "The 3' untranslated region of manganese superoxide dismutase RNA contains a translational enhancer element". *Biochemistry.* 37(46): 16298-16306, 1998.
87. Walther, F.J.; Wade, A.B.; Warburton, D. and Forman, H.J. "Ontogeny of antioxidant enzymes in the fetal lamb lung". *Exp Lung Res.* 17(1): 39-45, 1991.
88. Frank, L. and Groseclose, E.E. "Preparation for birth into an O₂-rich environment: the antioxidant enzymes in the developing rabbit lung". *Pediatr Res.* 18(3): 240-244, 1984.
89. Robinson, B.H. "The role of manganese superoxide dismutase in health and disease". *J Inherit Metab Dis.* 21(5): 598-603, 1998.
90. Mates, J.M.; Perez-Gomez, C. and Nunez de Castro, I. "Antioxidant enzymes and human diseases". *Clin Biochem.* 32(8): 595-603, 1999.
91. Young, I.S. and Woodside, J.V. "Antioxidants in health and disease". *J Clin Pathol.* 54(3): 176-186, 2001.
92. Mueller, S.; Riedel, H.D. and Stremmel, W. "Direct evidence for catalase as the predominant H₂O₂ -removing enzyme in human erythrocytes". *Blood.* 90(12): 4973-4978, 1997.
93. Goyal, M.M. and Basak, A. "Human catalase: looking for complete identity". *Protein Cell.* 1(10): 888-897, 2010.
94. Hunt, C.R.; Sim, J.E.; Sullivan, S.J.; Featherstone, T.; Golden, W.; Von Kapp-Herr, C.; Hock, R.A.; Gomez, R.A.; Parsian, A.J. and Spitz, D.R. "Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress". *Cancer Res.* 58(17): 3986-3992, 1998.
95. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. "Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease". *Biochem J.* 219(1): 1-14, 1984.
96. Vuillaume, M. "Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation". *Mutat Res.* 186(1): 43-72, 1987.
97. Yabuki, M.; Kariya, S.; Ishisaka, R.; Yasuda, T.; Yoshioka, T.; Horton, A.A. and Utsumi, K. "Resistance to nitric oxide-mediated apoptosis in HL-60 variant cells is associated with increased activities of Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase". *Free Radic Biol Med.* 26(3-4): 325-332, 1999.
98. Shull, S.; Heintz, N.H.; Periasamy, M.; Manohar, M.; Janssen, Y.M.; Marsh, J.P. and Mossman, B.T. "Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants". *J Biol Chem.* 266(36): 24398-24403, 1991.
99. Chen, T.; Jin, X.; Crawford, B.H.; Cheng, H.; Saafir, T.B.; Wagner, M.B.; Yuan, Z. and Ding, G. "Cardioprotection from oxidative stress in the newborn heart by activation of PPARgamma is mediated by catalase". *Free Radic Biol Med.* 53(2): 208-215, 2012.
100. Cao, C.; Leng, Y.; Liu, X.; Yi, Y.; Li, P. and Kufe, D. "Catalase is regulated by ubiquitination and proteasomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine kinases". *Biochemistry.* 42(35): 10348-10353, 2003.
101. Margis, R.; Dunand, C.; Teixeira, F.K. and Margis-Pinheiro, M. "Glutathione peroxidase family - an evolutionary overview". *FEBS J.* 275(15): 3959-3970, 2008.
102. Brigelius-Flohe, R. and Maiorino, M. "Glutathione peroxidases". *Biochim Biophys Acta.* 1830(5): 3289-3303, 2013.

103. Ghyselinck, N.B. and Dufaure, J.P. "A mouse cDNA sequence for epididymal androgen-regulated proteins related to glutathione peroxidase". *Nucleic Acids Res.* 18(23): 7144, 1990.
104. Dear, T.N.; Campbell, K. and Rabbitts, T.H. "Molecular cloning of putative odorant-binding and odorant-metabolizing proteins". *Biochemistry.* 30(43): 10376-10382, 1991.
105. "Nutrition Classics: Science, Volume 179, 1973, pages 588-591: Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase". *Nutr Rev.* 38(8): 280-283, 1980.
106. Ho, Y.S.; Magnenat, J.L.; Bronson, R.T.; Cao, J.; Gargano, M.; Sugawara, M. and Funk, C.D. "Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia". *J Biol Chem.* 272(26): 16644-16651, 1997.
107. Cheng, W.H.; Ho, Y.S.; Valentine, B.A.; Ross, D.A.; Combs, G.F., Jr. and Lei, X.G. "Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice". *J Nutr.* 128(7): 1070-1076, 1998.
108. Zmijewski, J.W.; Lorne, E.; Zhao, X.; Tsuruta, Y.; Sha, Y.; Liu, G. and Abraham, E. "Antiinflammatory effects of hydrogen peroxide in neutrophil activation and acute lung injury". *Am J Respir Crit Care Med.* 179(8): 694-704, 2009.
109. McClung, J.P.; Roneker, C.A.; Mu, W.; Lisk, D.J.; Langlais, P.; Liu, F. and Lei, X.G. "Development of insulin resistance and obesity in mice overexpressing cellular glutathione peroxidase". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(24): 8852-8857, 2004.
110. Brigelius-Flohe, R. and Kipp, A. "Glutathione peroxidases in different stages of carcinogenesis". *Biochim Biophys Acta.* 1790(11): 1555-1568, 2009.
111. Chu, F.F.; Doroshov, J.H. and Esworthy, R.S. "Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI". *J Biol Chem.* 268(4): 2571-2576, 1993.
112. Al-Taie, O.H.; Uceyler, N.; Eubner, U.; Jakob, F.; Mork, H.; Scheurlen, M.; Brigelius-Flohe, R.; Schottker, K.; Abel, J.; Thalheimer, A.; Katzenberger, T.; Illert, B.; Melcher, R. and Kohrle, J. "Expression profiling and genetic alterations of the selenoproteins GI-GPx and SePP in colorectal carcinogenesis". *Nutr Cancer.* 48(1): 6-14, 2004.
113. Esworthy, R.S.; Yang, L.; Frankel, P.H. and Chu, F.F. "Epithelium-specific glutathione peroxidase, Gpx2, is involved in the prevention of intestinal inflammation in selenium-deficient mice". *J Nutr.* 135(4): 740-745, 2005.
114. Whitin, J.C.; Bhamre, S.; Tham, D.M. and Cohen, H.J. "Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells". *Am J Physiol Renal Physiol.* 283(1): F20-28, 2002.
115. Schomburg, L. and Kohrle, J. "On the importance of selenium and iodine metabolism for thyroid hormone biosynthesis and human health". *Mol Nutr Food Res.* 52(11): 1235-1246, 2008.
116. Maeda, K.; Okubo, K.; Shimomura, I.; Mizuno, K.; Matsuzawa, Y. and Matsubara, K. "Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue". *Gene.* 190(2): 227-235, 1997.
117. Brigelius-Flohe, R. "Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases". *Free Radic Biol Med.* 27(9-10): 951-965, 1999.
118. Pryor, W.A. and Godber, S.S. "Noninvasive measures of oxidative stress status in humans". *Free Radic Biol Med.* 10(3-4): 177-184, 1991.
119. Catala, A. "An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay". *Int J Biochem Cell Biol.* 38(9): 1482-1495, 2006.
120. Nigam, S. and Schewe, T. "Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation". *Biochim Biophys Acta.* 1488(1-2): 167-181, 2000.
121. Green, John, C.; and Reed, D.R. "Mitochondria and Apoptosis". *Science.* 281(5381): 1309-1312, 1998.
122. Lee, S.H.; Oe, T. and Blair, I.A. "Vitamin C-induced decomposition of lipid hydroperoxides to endogenous genotoxins". *Science.* 292(5524): 2083-2086, 2001.
123. Parola, M.; Bellomo, G.; Robino, G.; Barrera, G. and Dianzani, M.U. "4-Hydroxynonenal as a biological signal: molecular basis and pathophysiological implications". *Antioxid Redox Signal.* 1(3): 255-284, 1999.

124. Benedetti, A.; Comporti, M. and Esterbauer, H. "Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids". *Biochim Biophys Acta.* 620(2): 281-296, 1980.
125. Cracowski, J.L.; Durand, T. and Bessard, G. "Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications". *Trends Pharmacol Sci.* 23(8): 360-366, 2002.
126. Delanty, N.; Reilly, M.; Pratico, D.; FitzGerald, D.J.; Lawson, J.A. and FitzGerald, G.A. "8-Epi PGF2 alpha: specific analysis of an isoeicosanoid as an index of oxidant stress in vivo". *Br J Clin Pharmacol.* 42(1): 15-19, 1996.
127. Montuschi, P.; Barnes, P.J. and Roberts, L.J., 2nd "Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress". *FASEB J.* 18(15): 1791-1800, 2004.
128. Draper, H.H.; Squires, E.J.; Mahmoodi, H.; Wu, J.; Agarwal, S. and Hadley, M. "A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials". *Free Radic Biol Med.* 15(4): 353-363, 1993.
129. Yeo, H.C.; Liu, J.; Helbock, H.J. and Ames, B.N. "Assay of malondialdehyde and other alkanals in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry". *Methods Enzymol.* 300: 70-78, 1999.
130. Hewinson, J.; Stevens, C.R. and Millar, T.M. "Vascular physiology and pathology of circulating xanthine oxidoreductase: from nucleotide sequence to functional enzyme". *Redox Rep.* 9(2): 71-79, 2004.
131. Meneshian, A. and Bulkley, G.B. "The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction". *Microcirculation.* 9(3): 161-175, 2002.
132. Granger, D.N. "Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury". *Am J Physiol.* 255(6 Pt 2): H1269-1275, 1988.
133. Jankov, R.P.; Kantores, C.; Pan, J. and Belik, J. "Contribution of xanthine oxidase-derived superoxide to chronic hypoxic pulmonary hypertension in neonatal rats". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294(2): L233-245, 2008.
134. Venugopal, R. and Jaiswal, A.K. "Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(25): 14960-14965, 1996.
135. Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Engel, J.D. and Yamamoto, M. "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain". *Genes Dev.* 13(1): 76-86, 1999.
136. Dinkova-Kostova, A.T.; Holtzclaw, W.D.; Cole, R.N.; Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Yamamoto, M. and Talalay, P. "Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(18): 11908-11913, 2002.
137. Hybertson, B.M.; Gao, B.; Bose, S.K. and McCord, J.M. "Oxidative stress in health and disease: the therapeutic potential of Nrf2 activation". *Mol Aspects Med.* 32(4-6): 234-246, 2011.
138. Huang, H.C.; Nguyen, T. and Pickett, C.B. "Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription". *J Biol Chem.* 277(45): 42769-42774, 2002.
139. Cho, H.Y.; Jedlicka, A.E.; Reddy, S.P.; Kensler, T.W.; Yamamoto, M.; Zhang, L.Y. and Kleeberger, S.R. "Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice". *Am J Respir Cell Mol Biol.* 26(2): 175-182, 2002.
140. Pietsch, E.C.; Chan, J.Y.; Torti, F.M. and Torti, S.V. "Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones". *J Biol Chem.* 278(4): 2361-2369, 2003.
141. Chen, P.C.; Vargas, M.R.; Pani, A.K.; Smeyne, R.J.; Johnson, D.A.; Kan, Y.W. and Johnson, J.A. "Nrf2-mediated neuroprotection in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: Critical role for the astrocyte". *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(8): 2933-2938, 2009.

142. Polotsky, V.Y.; Savransky, V.; Bevans-Fonti, S.; Reinke, C.; Li, J.; Grigoryev, D.N. and Shimoda, L.A. "Intermittent and Sustained Hypoxia Induce a Similar Gene Expression Profile in the Human Aortic Endothelial Cells". *Physiol Genomics*. 2010.
143. Sethy, N.K.; Singh, M.; Kumar, R.; Ilavazhagan, G. and Bhargava, K. "Upregulation of transcription factor NRF2-mediated oxidative stress response pathway in rat brain under short-term chronic hypobaric hypoxia". *Funct Integr Genomics*. 11(1): 119-137, 2011.
144. Schulke, S.; Dreidax, D.; Malik, A.; Burmester, T.; Nevo, E.; Band, M.; Avivi, A. and Hankeln, T. "Living with stress: regulation of antioxidant defense genes in the subterranean, hypoxia-tolerant mole rat, *Spalax*". *Gene*. 500(2): 199-206, 2012.
145. Zhang, H.; Liu, H.; Davies, K.J.; Sioutas, C.; Finch, C.E.; Morgan, T.E. and Forman, H.J. "Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments". *Free Radic Biol Med*. 52(9): 2038-2046, 2012.
146. Cho, H.Y.; Reddy, S.P.; Yamamoto, M. and Kleeberger, S.R. "The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis". *FASEB J*. 18(11): 1258-1260, 2004.
147. Rangasamy, T.; Cho, C.Y.; Thimmulappa, R.K.; Zhen, L.; Srisuma, S.S.; Kensler, T.W.; Yamamoto, M.; Petrache, I.; Tuder, R.M. and Biswal, S. "Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice". *J Clin Invest*. 114(9): 1248-1259, 2004.
148. Cho, H.Y.; Reddy, S.P. and Kleeberger, S.R. "Nrf2 defends the lung from oxidative stress". *Antioxid Redox Signal*. 8(1-2): 76-87, 2006.
149. Chang, S.W.; Stelzner, T.J.; Weil, J.V. and Voelkel, N.F. "Hypoxia increases plasma glutathione disulfide in rats". *Lung*. 167(5): 269-276, 1989.
150. Kehrer, J.P. and Lund, L.G. "Cellular reducing equivalents and oxidative stress". *Free Radic Biol Med*. 17(1): 65-75, 1994.
151. Duranteau, J.; Chandel, N.S.; Kulisz, A.; Shao, Z. and Schumacker, P.T. "Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes". *J Biol Chem*. 273(19): 11619-11624, 1998.
152. Schild, L.; Reinheckel, T.; Reiser, M.; Horn, T.F.; Wolf, G. and Augustin, W. "Nitric oxide produced in rat liver mitochondria causes oxidative stress and impairment of respiration after transient hypoxia". *FASEB J*. 17(15): 2194-2201, 2003.
153. Maiti, P.; Singh, S.B.; Sharma, A.K.; Muthuraju, S.; Banerjee, P.K. and Ilavazhagan, G. "Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain". *Neurochem Int*. 49(8): 709-716, 2006.
154. Magalhaes, J.; Ascensao, A.; Viscor, G.; Soares, J.; Oliveira, J.; Marques, F. and Duarte, J. "Oxidative stress in humans during and after 4 hours of hypoxia at a simulated altitude of 5500 m". *Aviat Space Environ Med*. 75(1): 16-22, 2004.
155. Radak, Z.; Lee, K.; Choi, W.; Sunoo, S.; Kizaki, T.; Oh-ishi, S.; Suzuki, K.; Taniguchi, N.; Ohno, H. and Asano, K. "Oxidative stress induced by intermittent exposure at a simulated altitude of 4000 m decreases mitochondrial superoxide dismutase content in soleus muscle of rats". *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 69(5): 392-395, 1994.
156. Nakanishi, K.; Tajima, F.; Nakamura, A.; Yagura, S.; Ookawara, T.; Yamashita, H.; Suzuki, K.; Taniguchi, N. and Ohno, H. "Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats". *J Physiol*. 489 (Pt 3): 869-876, 1995.
157. Torres, C.A.; Perales, M.I.; Zúñiga, H. and Carranza, E. "Niveles de malondialdehído y catalasa en tejidos de cobayos nativos de la altura". *Ciencia e Investigación*. 7(1): 28 - 34, 2004.
158. Hoshikawa, Y.; Ono, S.; Suzuki, S.; Tanita, T.; Chida, M.; Song, C.; Noda, M.; Tabata, T.; Voelkel, N.F. and Fujimura, S. "Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia". *J Appl Physiol* (1985). 90(4): 1299-1306, 2001.
159. Grishko, V.; Solomon, M.; Breit, J.F.; Killilea, D.W.; Ledoux, S.P.; Wilson, G.L. and Gillespie, M.N. "Hypoxia promotes oxidative base modifications in the pulmonary artery endothelial cell VEGF gene". *FASEB J*. 15(7): 1267-1269, 2001.
160. Block, E.R.; Patel, J.M. and Edwards, D. "Mechanism of hypoxic injury to pulmonary artery endothelial cell plasma membranes". *Am J Physiol*. 257(2 Pt 1): C223-231, 1989.

161. Lin, M.J.; Yang, X.R.; Cao, Y.N. and Sham, J.S. "Hydrogen peroxide-induced Ca²⁺ mobilization in pulmonary arterial smooth muscle cells". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 292(6): L1598-1608, 2007.
162. Pourmahram, G.E.; Snetkov, V.A.; Shaifta, Y.; Drndarski, S.; Knock, G.A.; Aaronson, P.I. and Ward, J.P. "Constriction of pulmonary artery by peroxide: role of Ca²⁺ release and PKC". *Free Radic Biol Med*. 45(10): 1468-1476, 2008.
163. Choi, S.L.; Kim, S.J.; Lee, K.T.; Kim, J.; Mu, J.; Birnbaum, M.J.; Soo Kim, S. and Ha, J. "The regulation of AMP-activated protein kinase by H₂O₂". *Biochem Biophys Res Commun*. 287(1): 92-97, 2001.
164. Jin, L.; Ying, Z. and Webb, R.C. "Activation of Rho/Rho kinase signaling pathway by reactive oxygen species in rat aorta". *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287(4): H1495-1500, 2004.
165. Liu, J.Q.; Sham, J.S.; Shimoda, L.A.; Kuppusamy, P. and Sylvester, J.T. "Hypoxic constriction and reactive oxygen species in porcine distal pulmonary arteries". *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 285(2): L322-333, 2003.
166. Rathore, R.; Zheng, Y.M.; Niu, C.F.; Liu, Q.H.; Korde, A.; Ho, Y.S. and Wang, Y.X. "Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]_i and [Ca²⁺]_i through the mitochondrial ROS-PKCε signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells". *Free Radic Biol Med*. 45(9): 1223-1231, 2008.
167. Wang, Q.S.; Zheng, Y.M.; Dong, L.; Ho, Y.S.; Guo, Z. and Wang, Y.X. "Role of mitochondrial reactive oxygen species in hypoxia-dependent increase in intracellular calcium in pulmonary artery myocytes". *Free Radic Biol Med*. 42(5): 642-653, 2007.
168. Chandel, N.S.; Maltepe, E.; Goldwasser, E.; Mathieu, C.E.; Simon, M.C. and Schumacker, P.T. "Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(20): 11715-11720, 1998.
169. Turrens, J.F. "Mitochondrial formation of reactive oxygen species". *J Physiol*. 552(Pt 2): 335-344, 2003.
170. Bakonyi, T. and Radak, Z. "High altitude and free radicals". *Journal of Sports Science and Medicine*. 3(2): 64-69, 2004.
171. Semenza, G.L. "Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1". *Semin Cancer Biol*. 19(1): 12-16, 2009.
172. Wheaton, W.W. and Chandel, N.S. "Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism". *Am J Physiol Cell Physiol*. 300(3): C385-393, 2011.
173. Halliwell, B. "Antioxidants in human health and disease". *Annu Rev Nutr*. 16: 33-50, 1996.
174. Aruoma, O.I. "Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease". *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 75(2): 199-212, 1998.
175. Devasagayam, T.P.; Tilak, J.C.; Boloor, K.K.; Sane, K.S.; Ghaskadbi, S.S. and Lele, R.D. "Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects". *J Assoc Physicians India*. 52: 794-804, 2004.
176. Hamid, A.; Aiyelaagbe, O.; Usman, L.; Ameen, O. and Lawal, A. "Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications". *Afr J Pure Appl Chem*. 4(8): 142-151, 2010.
177. Halliwell, B. "Free radicals and antioxidants - quo vadis?". *Trends Pharmacol Sci*. 32(3): 125-130, 2011.
178. Halliwell, B. "Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment". *Drugs Aging*. 18(9): 685-716, 2001.
179. Lehr, H.A.; Vajkoczy, P.; Menger, M.D. and Arfors, K.E. "Do vitamin E supplements in diets for laboratory animals jeopardize findings in animal models of disease?". *Free Radic Biol Med*. 26(3-4): 472-481, 1999.
180. Vivekananthan, D.P.; Penn, M.S.; Sapp, S.K.; Hsu, A. and Topol, E.J. "Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials". *Lancet*. 361(9374): 2017-2023, 2003.
181. Bjelakovic, G.; Nikolova, D.; Glud, L.L.; Simonetti, R.G. and Glud, C. "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis". *JAMA*. 297(8): 842-857, 2007.

182. Bjelakovic, G.; Nikolova, D.; Simonetti, R.G. and Gluud, C. "Systematic review: primary and secondary prevention of gastrointestinal cancers with antioxidant supplements". *Aliment Pharmacol Ther.* 28(6): 689-703, 2008.
183. Loke, W.M.; Proudfoot, J.M.; Hodgson, J.M.; McKinley, A.J.; Hime, N.; Magat, M.; Stocker, R. and Croft, K.D. "Specific dietary polyphenols attenuate atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice by alleviating inflammation and endothelial dysfunction". *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(4): 749-757, 2010.
184. Xu, H.; Perez-Cuevas, R.; Xiong, X.; Reyes, H.; Roy, C.; Julien, P.; Smith, G.; von Dadelszen, P.; Leduc, L.; Audibert, F.; Moutquin, J.M.; Piedboeuf, B.; Shatenstein, B.; Parra-Cabrera, S.; Choquette, P.; Winsor, S.; Wood, S.; Benjamin, A.; Walker, M.; Helewa, M.; Dube, J.; Tawagi, G.; Seaward, G.; Ohlsson, A.; Magee, L.A.; Olatunbosun, F.; Gratton, R.; Shear, R.; Demianczuk, N.; Collet, J.P.; Wei, S. and Fraser, W.D. "An international trial of antioxidants in the prevention of preeclampsia (INTAPP)". *Am J Obstet Gynecol.* 202(3): 239 e231-239 e210, 2010.
185. Vanecek, J. "Cellular mechanisms of melatonin action". *Physiol Rev.* 78(3): 687-721, 1998.
186. Yellon, S.M. and Longo, L.D. "Effect of maternal pinealectomy and reverse photoperiod on the circadian melatonin rhythm in the sheep and fetus during the last trimester of pregnancy". *Biol Reprod.* 39(5): 1093-1099, 1988.
187. Claypool, L.E.; Wood, R.I.; Yellon, S.M. and Foster, D.L. "The ontogeny of melatonin secretion in the lamb". *Endocrinology.* 124(5): 2135-2143, 1989.
188. Seron-Ferre, M.; Torres-Farfan, C.; Forcelledo, M.L. and Valenzuela, G.J. "The development of circadian rhythms in the fetus and neonate". *Semin Perinatol.* 25(6): 363-370, 2001.
189. Reiter, R.J.; Tan, D.X.; Manchester, L.C.; Lopez-Burillo, S.; Sainz, R.M. and Mayo, J.C. "Melatonin: detoxification of oxygen and nitrogen-based toxic reactants". *Adv Exp Med Biol.* 527: 539-548, 2003.
190. Rodriguez, C.; Mayo, J.C.; Sainz, R.M.; Antolin, I.; Herrera, F.; Martin, V. and Reiter, R.J. "Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin". *J Pineal Res.* 36(1): 1-9, 2004.
191. Reiter, R.J.; Acuna-Castroviejo, D.; Tan, D.X. and Burkhardt, S. "Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system". *Ann N Y Acad Sci.* 939: 200-215, 2001.
192. Nosjean, O.; Ferro, M.; Coge, F.; Beauverger, P.; Henlin, J.M.; Lefoulon, F.; Fauchere, J.L.; Delagrangue, P.; Canet, E. and Boutin, J.A. "Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2". *J Biol Chem.* 275(40): 31311-31317, 2000.
193. Reiter, R.J.; Tan, D.X.; Osuna, C. and Gitto, E. "Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review". *J Biomed Sci.* 7(6): 444-458, 2000.
194. Reiter, R.J.; Carneiro, R.C. and Oh, C.S. "Melatonin in relation to cellular antioxidative defense mechanisms". *Horm Metab Res.* 29(8): 363-372, 1997.
195. Tan, D.X.; Manchester, L.C.; Reiter, R.J.; Qi, W.B.; Karbownik, M. and Calvo, J.R. "Significance of melatonin in antioxidative defense system: reactions and products". *Biol Signals Recept.* 9(3-4): 137-159, 2000.
196. Tan, D.X.; Hardeland, R.; Manchester, L.C.; Poeggeler, B.; Lopez-Burillo, S.; Mayo, J.C.; Sainz, R.M. and Reiter, R.J. "Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical". *J Pineal Res.* 34(4): 249-259, 2003.
197. Torres-Farfan, C.; Valenzuela, F.J.; Mondaca, M.; Valenzuela, G.J.; Krause, B.; Herrera, E.A.; Riquelme, R.; Llanos, A.J. and Seron-Ferre, M. "Evidence of a role for melatonin in fetal sheep physiology: direct actions of melatonin on fetal cerebral artery, brown adipose tissue and adrenal gland". *J Physiol.* 586(16): 4017-4027, 2008.
198. Thakor, A.S.; Herrera, E.A.; Seron-Ferre, M. and Giussani, D.A. "Melatonin and vitamin C increase umbilical blood flow via nitric oxide-dependent mechanisms". *J Pineal Res.* 49(4): 399-406, 2010.
199. Das, R.; Balonan, L.; Ballard, H.J. and Ho, S. "Chronic hypoxia inhibits the antihypertensive effect of melatonin on pulmonary artery". *Int J Cardiol.* 126(3): 340-345, 2008.

200. Brugger, P.; Marktl, W. and Herold, M. "Impaired nocturnal secretion of melatonin in coronary heart disease". *Lancet*. 345(8962): 1408, 1995.
201. Scheer, F.A.; Van Montfrans, G.A.; van Someren, E.J.; Mairuhu, G. and Buijs, R.M. "Daily nighttime melatonin reduces blood pressure in male patients with essential hypertension". *Hypertension*. 43(2): 192-197, 2004.
202. Anwar, M.M.; Meki, A.R. and Rahma, H.H. "Inhibitory effects of melatonin on vascular reactivity: possible role of vasoactive mediators". *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 130(3): 357-367, 2001.
203. Jahnke, G.; Marr, M.; Myers, C.; Wilson, R.; Travlos, G. and Price, C. "Maternal and developmental toxicity evaluation of melatonin administered orally to pregnant Sprague-Dawley rats". *Toxicol Sci*. 50(2): 271-279, 1999.
204. Gitto, E.; Reiter, R.J.; Amodio, A.; Romeo, C.; Cuzzocrea, E.; Sabatino, G.; Buonocore, G.; Cordaro, V.; Trimarchi, G. and Barberi, I. "Early indicators of chronic lung disease in preterm infants with respiratory distress syndrome and their inhibition by melatonin". *J Pineal Res*. 36(4): 250-255, 2004.
205. Buonocore, G. and Groenendaal, F. "Anti-oxidant strategies". *Semin Fetal Neonatal Med*. 12(4): 287-295, 2007.
206. Richter, H.G.; Hansell, J.A.; Raut, S. and Giussani, D.A. "Melatonin improves placental efficiency and birth weight and increases the placental expression of antioxidant enzymes in undernourished pregnancy". *J Pineal Res*. 46(4): 357-364, 2009.
207. Herrera, E.A.; Reyes, R.V.; Giussani, D.A.; Riquelme, R.A.; Sanhueza, E.M.; Ebensperger, G.; Casanello, P.; Mendez, N.; Ebensperger, R.; Sepulveda-Kattan, E.; Pulgar, V.M.; Cabello, G.; Blanco, C.E.; Hanson, M.A.; Parer, J.T. and Llanos, A.J. "Carbon monoxide: a novel pulmonary artery vasodilator in neonatal llamas of the Andean altiplano". *Cardiovasc Res*. 77(1): 197-201, 2008.
208. Chomczynski, P. and Sacchi, N. "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Anal Biochem*. 162(1): 156-159, 1987.
209. Ebensperger, G.; Ebensperger, R.; Herrera, E.A.; Riquelme, R.A.; Sanhueza, E.M.; Lesage, F.; Marengo, J.J.; Tejo, R.I.; Llanos, A.J. and Reyes, R.V. "Fetal brain hypometabolism during prolonged hypoxaemia in the llama". *J Physiol*. 567(Pt 3): 963-975, 2005.
210. Paglia, D.E. and Valentine, W.N. "Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase". *J Lab Clin Med*. 70(1): 158-169, 1967.
211. Morrow, J.D.; Frei, B.; Longmire, A.W.; Gaziano, J.M.; Lynch, S.M.; Shyr, Y.; Strauss, W.E.; Oates, J.A. and Roberts, L.J., 2nd "Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage". *N Engl J Med*. 332(18): 1198-1203, 1995.
212. Ohkawa, H.; Ohishi, N. and Yagi, K. "Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction". *Anal Biochem*. 95(2): 351-358, 1979.
213. Okatani, Y.; Wakatsuki, A. and Kaneda, C. "Melatonin increases activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in fetal rat brain". *J Pineal Res*. 28(2): 89-96, 2000.
214. Mayo, J.C.; Sainz, R.M.; Antoli, I.; Herrera, F.; Martin, V. and Rodriguez, C. "Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression". *Cell Mol Life Sci*. 59(10): 1706-1713, 2002.
215. Taskiran, D.; Tanyalcin, T.; Sozmen, E.Y.; Peker, G.O.; Gulmen, V.; Cagli, S.; Kanit, L.; Tekeli, G.; Barcin, E.; Zileli, M. and Kutay, F.Z. "The effects of melatonin on the antioxidant systems in experimental spinal injury". *Int J Neurosci*. 104(1-4): 63-73, 2000.
216. Tomas-Zapico, C.; Coto-Montes, A.; Martinez-Fraga, J.; Rodriguez-Colunga, M.J.; Hardeland, R. and Tolivia, D. "Effects of delta-aminolevulinic acid and melatonin in the harderian gland of female Syrian hamsters". *Free Radic Biol Med*. 32(11): 1197-1204, 2002.
217. Gurlek, A.; Aydogan, H.; Parlakpinar, H.; Bay-Karabulut, A.; Celik, M.; Sezgin, N. and Acet, A. "Protective effect of melatonin on random pattern skin flap necrosis in pinealectomized rat". *J Pineal Res*. 36(1): 58-63, 2004.
218. Albarran, M.T.; Lopez-Burillo, S.; Pablos, M.I.; Reiter, R.J. and Agapito, M.T. "Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light". *J Pineal Res*. 30(4): 227-233, 2001.

219. Martin, V.; Sainz, R.M.; Mayo, J.C.; Antolin, I.; Herrera, F. and Rodriguez, C. "Daily rhythm of gene expression in rat superoxide dismutases". *Endocr Res.* 29(1): 83-95, 2003.
220. Pan, L.; Fu, J.H.; Xue, X.D.; Xu, W.; Zhou, P. and Wei, B. "Melatonin protects against oxidative damage in a neonatal rat model of bronchopulmonary dysplasia". *World J Pediatr.* 5(3): 216-221, 2009.
221. Reiter, R.J. "Oxidative processes and antioxidative defense mechanisms in the aging brain". *FASEB J.* 9(7): 526-533, 1995.
222. Barlow-Walden, L.R.; Reiter, R.J.; Abe, M.; Pablos, M.; Menendez-Pelaez, A.; Chen, L.D. and Poeggeler, B. "Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity". *Neurochem Int.* 26(5): 497-502, 1995.
223. Pablos, M.I.; Agapito, M.T.; Gutierrez, R.; Recio, J.M.; Reiter, R.J.; Barlow-Walden, L.; Acuna-Castroviejo, D. and Menendez-Pelaez, A. "Melatonin stimulates the activity of the detoxifying enzyme glutathione peroxidase in several tissues of chicks". *J Pineal Res.* 19(3): 111-115, 1995.
224. Hsu, C.H.; Chi, B.C.; Liu, M.Y.; Li, J.H.; Chen, C.J. and Chen, R.Y. "Phosphine-induced oxidative damage in rats: role of glutathione". *Toxicology.* 179(1-2): 1-8, 2002.
225. Chan, A.S.; Lai, F.P.; Lo, R.K.; Voyno-Yasenetskaya, T.A.; Stanbridge, E.J. and Wong, Y.H. "Melatonin mt1 and MT2 receptors stimulate c-Jun N-terminal kinase via pertussis toxin-sensitive and -insensitive G proteins". *Cell Signal.* 14(3): 249-257, 2002.
226. Benitez-King, G.; Huerto-Delgadillo, L. and Anton-Tay, F. "Binding of 3H-melatonin to calmodulin". *Life Sci.* 53(3): 201-207, 1993.
227. Gilad, E.; Wong, H.R.; Zingarelli, B.; Virag, L.; O'Connor, M.; Salzman, A.L. and Szabo, C. "Melatonin inhibits expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in murine macrophages: role of inhibition of NFkappaB activation". *FASEB J.* 12(9): 685-693, 1998.
228. Ross, A.W.; Barrett, P.; Mercer, J.G. and Morgan, P.J. "Melatonin suppresses the induction of AP-1 transcription factor components in the pars tuberalis of the pituitary". *Mol Cell Endocrinol.* 123(1): 71-80, 1996.
229. Urata, Y.; Honma, S.; Goto, S.; Todoroki, S.; Iida, T.; Cho, S.; Honma, K. and Kondo, T. "Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells". *Free Radic Biol Med.* 27(7-8): 838-847, 1999.
230. Poli, G.; Schaur, R.J.; Siems, W.G. and Leonarduzzi, G. "4-hydroxynonenal: a membrane lipid oxidation product of medicinal interest". *Med Res Rev.* 28(4): 569-631, 2008.
231. Siems, W. and Grune, T. "Intracellular metabolism of 4-hydroxynonenal". *Mol Aspects Med.* 24(4-5): 167-175, 2003.
232. Montt, C.; Ebensperger, G.; Torres, F.; Díaz, M.; Santos, D.; Reyes, V.R.; Llanos, A.J.; Seron-Ferre, M. and Herrera, E.A. "Melatonin improves endothelial function in pulmonary hypertensive newborn sheep". 50a Reunión Sociedad Latinoamericana de Investigación Pediátrica, Buenos Aires, Argentina. 2012.
233. Boon, P.J.; Marinho, H.S.; Oosting, R. and Mulder, G.J. "Glutathione conjugation of 4-hydroxy-trans-2,3-nonenal in the rat in vivo, the isolated perfused liver and erythrocytes". *Toxicol Appl Pharmacol.* 159(3): 214-223, 1999.
234. Andreadou, I.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Spyropoulou, E. and Siatra, T. "Reactions of indole derivatives with cardioprotective activity with reactive oxygen species. Comparison with melatonin". *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 51(10): 1128-1131, 2003.
235. Sokolovic, D.; Djindjic, B.; Nikolic, J.; Bjelakovic, G.; Pavlovic, D.; Kocic, G.; Krstic, D.; Cvetkovic, T. and Pavlovic, V. "Melatonin reduces oxidative stress induced by chronic exposure of microwave radiation from mobile phones in rat brain". *J Radiat Res.* 49(6): 579-586, 2008.
236. Wakatsuki, A.; Okatani, Y.; Shinohara, K.; Ikenoue, N. and Fukaya, T. "Melatonin protects against ischemia/reperfusion-induced oxidative damage to mitochondria in fetal rat brain". *J Pineal Res.* 31(2): 167-172, 2001.
237. Ohta, Y.; Kongo-Nishimura, M.; Matura, T.; Yamada, K.; Kitagawa, A. and Kishikawa, T. "Melatonin prevents disruption of hepatic reactive oxygen species metabolism in rats treated with carbon tetrachloride". *J Pineal Res.* 36(1): 10-17, 2004.

238. Abuja, P.M. and Albertini, R. "Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins". *Clin Chim Acta.* 306(1-2): 1-17, 2001.
239. Niki, E. "Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects". *Free Radic Biol Med.* 47(5): 469-484, 2009.
240. Loboda, A.; Stachurska, A.; Florczyk, U.; Rudnicka, D.; Jazwa, A.; Wegrzyn, J.; Kozakowska, M.; Stalinska, K.; Poellinger, L.; Levonen, A.L.; Yla-Herttuala, S.; Jozkowicz, A. and Dulak, J. "HIF-1 induction attenuates Nrf2-dependent IL-8 expression in human endothelial cells". *Antioxid Redox Signal.* 11(7): 1501-1517, 2009.
241. Welin, A.K.; Svedin, P.; Lapatto, R.; Sultan, B.; Hagberg, H.; Gressens, P.; Kjellmer, I. and Mallard, C. "Melatonin reduces inflammation and cell death in white matter in the mid-gestation fetal sheep following umbilical cord occlusion". *Pediatr Res.* 61(2): 153-158, 2007.
242. Aversa, S.; Pellegrino, S.; Barberi, I.; Reiter, R.J. and Gitto, E. "Potential utility of melatonin as an antioxidant during pregnancy and in the perinatal period". *J Matern Fetal Neonatal Med.* 25(3): 207-221, 2012.
243. Robertson, N.J.; Faulkner, S.; Fleiss, B.; Bainbridge, A.; Andorka, C.; Price, D.; Powell, E.; Lecky-Thompson, L.; Thei, L.; Chandrasekaran, M.; Hristova, M.; Cady, E.B.; Gressens, P.; Golay, X. and Raivich, G. "Melatonin augments hypothermic neuroprotection in a perinatal asphyxia model". *Brain.* 136(Pt 1): 90-105, 2013.
244. Tutunculer, F.; Eskiocak, S.; Basaran, U.N.; Ekuklu, G.; Ayvaz, S. and Vatansever, U. "The protective role of melatonin in experimental hypoxic brain damage". *Pediatr Int.* 47(4): 434-439, 2005.
245. Robertson, N.J.; Tan, S.; Groenendaal, F.; van Bel, F.; Juul, S.E.; Bennet, L.; Derrick, M.; Back, S.A.; Valdez, R.C.; Northington, F.; Gunn, A.J. and Mallard, C. "Which neuroprotective agents are ready for bench to bedside translation in the newborn infant?". *J Pediatr.* 160(4): 544-552 e544, 2012.
246. Okatani, Y.; Okamoto, K.; Hayashi, K.; Wakatsuki, A.; Tamura, S. and Sagara, Y. "Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term". *J Pineal Res.* 25(3): 129-134, 1998.
247. Vitte, P.A.; Harthe, C.; Lestage, P.; Claustrat, B. and Bobillier, P. "Plasma, cerebrospinal fluid, and brain distribution of ¹⁴C-melatonin in rat: a biochemical and autoradiographic study". *J Pineal Res.* 5(5): 437-453, 1988.
248. Mistraretti, G.; Sabbatini, G.; Taverna, M.; Figini, M.A.; Umbrello, M.; Magni, P.; Ruscica, M.; Dozio, E.; Esposti, R.; DeMartini, G.; Frascini, F.; Rezzani, R.; Reiter, R.J. and Iapichino, G. "Pharmacokinetics of orally administered melatonin in critically ill patients". *J Pineal Res.* 48(2): 142-147, 2010.

ANEXO – Impacto científico de la Tesis

Este estudio generó varias presentaciones en congresos nacionales e internacionales, además de un manuscrito en preparación:

1. **Torres F**, Montt C, González A, Ebensperger G, Reyes VR, Llanos AJ, Herrera EA. Melatonin modifies the pulmonary antioxidant capacity in neonates gestated under chronic hypoxia. 40th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society. Puerto Varas, Chile, September 2013 (presentación oral).
2. González-Candía A, **Torres F**, Montt C, Llanos AJ, Reyes VR, Herrera EA. Melatonina aumenta la expresión y actividad de enzimas antioxidantes en neonatos con hipertensión pulmonar. II Jornada de Estudio en Hipertensión del Embarazo-I Jornada de Investigación Clínico-Básica en Patologías del Embarazo. Universidad del Biobío, Chillan, Chile, Abril, 2013 (presentación oral).
3. **Torres F**, Santos D, Diaz M, Chubretovic M, Montt C, Reyes RV, Serón-Ferré M, Llanos AJ, Herrera EA. Melatonin modifies cardiac function in pulmonary hypertensive neonates. 50a Reunión Sociedad Latinoamericana de Investigación Pediátrica, Buenos Aires, Argentina, Octubre 2012 (presentación oral). **En esta presentación oral se mostraron los efectos a nivel cardiaco que ejerce melatonina en enzimas antioxidantes y su mejora en la función endotelial. Esta presentación estuvo premiada dentro de las mejores 16 trabajos del congreso.**
4. Montt C, Ebensperger G, **Torres F**, Díaz M, Santos D, Reyes VR, Llanos AJ, Serón-Ferré M, Herrera EA. Melatonin improves endothelial function in pulmonary hypertensive newborn sheep. 50a Reunión Sociedad Latinoamericana de Investigación Pediátrica, Buenos Aires, Argentina, Octubre 2012 (presentación oral).
5. **Torres F**, Montt C, Herrera EA. Melatonina mejora la capacidad antioxidante y la función vascular pulmonar neonatal. Congreso Ciencia Joven 2012, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Septiembre 2012. **En este trabajo se demostraron los efectos de melatonina a nivel pulmonar como estimuladora de enzimas antioxidantes y su mejora en la función vascular en neonatos de oveja gestados y nacidos en altura. La relevancia de los resultados logró que la propuesta obtuviera el tercer lugar entre más de 100 expositores.**
6. Montt C, Ebensperger G, Díaz M, **Torres F**, Santos D, Chubretovic M, Reyes VR, Llanos AJ, Serón-Ferré M, Herrera EA. Melatonin improves pulmonary vascular reactivity and histomorphometry in pulmonary hypertensive newborn sheep. 39th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society. Utrecht, The Netherlands, July 2012.
7. **Torres F**, Santos D, Díaz M, Chubretovic M, Montt C, Ebensperger G, Reyes VR, Llanos AJ, Herrera EA. Postnatal melatonin modifies the cardiopulmonary function in high altitude newborn sheep. 39th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society. Utrecht, The Netherlands, July 2012 (presentación oral).
8. **Manuscrito en preparación: Melatonin reduces oxidative stress and improves vascular function in pulmonary hypertensive newborn sheep.** **Torres F**, González-Candía A, Montt C, Diaz M, Chubretovic M, Ebensperger G, Reyes VR, Llanos AJ, Serón-Ferré M, Herrera EA.