

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
MAYOR DE SAN MARCOS**  
*(Universidad del Perú, Decana de América)*



**Facultad de Medicina Veterinaria**  
Escuela Académico Profesional de Medicina Veterinaria

**“EVIDENCIA DE LA PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NITRICO EN  
LA ADAPTACIÓN A LA ALTURA EN RATAS ALBINAS”**

Tesis para optar el Título de Profesional de:  
**Médico Veterinario**

**RENÁN FERNANDO GARCÍA BRACAMONTE**  
Bachiller en Medicina Veterinaria

Lima - Perú  
2005

## CONTENIDO

Resumen en español.....	i
Resumen en inglés.....	ii
Lista de Tablas y esquemas.....	iii
Apéndices.....	iv
I Introducción.....	1
II Revisión Bibliográfica.....	3
2.1 Respuesta del organismo a la Altura.....	3
2.2 Oxido Nítrico.....	6
2.3 Oxido Nítrico y su relación con la Hipoxia.....	9
III Materiales y Métodos.....	14
3.1 Lugar de Ejecución.....	14
3.2 Animales.....	14
3.3 Materiales.....	14
3.4 Método Experimental.....	17
3.4.1 Mantenimiento de los animales de experimentación.....	17
3.4.2 Selección y tratamiento de los animales.....	17
3.4.3 Determinación de los niveles de Nitritos y Nitratos.....	18
3.4.3.1 Método de Griess.....	18
3.4.3.2 Procedimiento.....	18
3.5 Método Estadístico.....	18
IV Resultados y Discusión.....	20

V Conclusiones.....	26
VI Literatura citada.....	27

## **LISTA DE TABLAS Y ESQUEMAS**

**Tabla 1.** Distribución de los grupos de animales de experimentación.

**Tabla 2.** Valores de Óxido Nítrico en ratas sometidas a hipoxia medioambiental comparados con grupo control.

**Esquema 1.** Valores de Oxido Nítrico en hipoxia medioambiental.

## APENDICE

**Cuadro 1.** Comparación de los valores de Óxido Nítrico entre grupo hipoxia y grupo control.

**Foto 1.** Ratas control a nivel del mar.

**Foto 2.** Ratas sometidas a hipoxia medioambiental.

**Foto 3.** Toma de muestra. Huancayo.

**Foto 4.** Toma de muestra. Huancayo.

**Figura 1.** Síntesis del Óxido nítrico, a partir de la L-Arginina.

**Figura 2.** Difusión del Óxido Nítrico en el endotelio vascular.

## RESUMEN

El NO participa en una amplia gama de procesos biológicos, entre ellos se presume la adaptación a la hipoxia medioambiental. Por tal motivo se determinaron los niveles de nitritos en plasma en un total de 270 ratas albinas machos, divididas en dos ensayos: la mitad sometidos a hipoxia a la altura de 3,320 m.s.n.m confrontados a un grupo control a nivel del mar. La determinación del óxido nítrico (NO) fue indirecta mediante la cuantificación de los nitritos ( $\text{NO}_2$ ) y nitratos ( $\text{NO}_3$ ) por la reacción de Griess, (1879).

Todos los animales fueron muestreados en grupos de 15 los días 1, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 respectivamente.

La mayor concentración de óxido nítrico en el grupo hipoxia medioambiental se encontró en el día 2 de muestreo ( $\alpha = 0.05$ ). Los niveles plasmáticos de óxido nítrico en el grupo hipoxia medioambiental presentaron diferencias significativas con el grupo control ( $p$  – valor = 0.001) encontrándose incrementados con respecto al grupo control ( $\alpha = 0.05$ ).

Estos resultados proponen que la hipoxia medioambiental produce un aumento de la síntesis de ON, como consecuencia de procesos adaptativos a la altura, corroborando los resultados de otros trabajos e investigaciones.

Palabras clave: óxido nítrico, hipoxia medioambiental, enfermedad de altura.

## SUMMARY

NO participate in an ample rate of biological processes, among them presumes the adaptation to the environmental hypoxia. By such reason the plasma levels of nitrates were determined in a total of 270 rats male, divided in two tests: half put under hypoxia to the height of 3.320 mts. confronted to a group control at level of the sea). The determination of nitric oxide (NO) was indirect by means of the cuantification nitrates ( $\text{NO}_2$ ) and nitrites ( $\text{NO}_3$ ), by the reaction of Griess, (1879).

All the animals were tested in groups of 15, on the days 1, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 respectively. The greater concentration of NO in the group submissive environmental hypoxia was in day 2 of sampling ( $\alpha= 0.05$ ). The NO levels in the hypoxia environmental group presented significant differences with the group control (p – value = 0,001) being increased with respect to the group control ( $\alpha= 0.05$ ).

These results propose that environmental hypoxia produces an increase of the synthesis of nitric oxide, consequence of adaptive processes to the height, corroborating the results of other works and investigations.

Key words: nitric oxide, environmental hypoxia, high attitude illness.

## I. INTRODUCCIÓN

La exposición de un organismo a las grandes altitudes involucra respuestas a la baja presión de oxígeno y al frío predominante en estas áreas lo que produce interacciones celulares complejas conllevando a vasoconstricción pulmonar, policitemia y remodelación vascular pulmonar. Las células sometidas a hipoxia van a producir y liberar sustancias como el óxido nítrico (NO) y la endotelina (ET), los cuales intervienen significativamente en el desarrollo de la enfermedad, que es conocida como mal de altura (Will *et al.*, 1962; Kuida *et al.*, 1962; Cueva, 1974).

Dentro de los factores intrínsecos involucrados está el NO que es un potente vasodilatador y que podría estar jugando un rol importante en la adaptación de los seres vivos a la hipoxia (Malyshev *et al.* 1999; Manukhina *et al.* 1999).

El NO es un gas biológicamente activo producido por casi todos los tejidos del organismo, el cual se constituye a partir del aminoácido esencial L-arginina, en una reacción catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS). Es una molécula multifuncional producida por distintos tipos celulares en casi todos los sistemas orgánicos y es esencial en diversos procesos biológicos, su determinación se hace de forma indirecta a través de uno de sus metabolitos estables: el nitrito.



El presente estudio, tiene por objetivo determinar los niveles de nitritos y nitratos en ratas adultas expuestas durante 42 días a la altura de 3,230 m.s.n.m. (Huancayo) a diferentes tiempos de hipoxia medioambiental.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Respuesta del Organismo a la Altura

La exposición de especies domésticas a condiciones medioambientales de altura produce la enfermedad conocida como mal de altura, mal de pecho, "brisket disease" o síndrome ascítico en el caso de las aves, cuya presentación esta influenciada por diversos factores y ocurre en zonas montañosas con altitudes mayores a los 1500 metros (Will *et al.*, 1962; Kuida *et al.*, 1962; Cueva, 1968).

La respuesta de los seres vivos a estas condiciones involucra interacciones intercelulares complejas las cuales están mediadas por la liberación de factores de crecimiento, citoquinas, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y mensajeros biológicos (Kourembanas *et al.*, 1997).

Durante el proceso de adaptación a la altura se genera la activación de genes que inducen, la producción de sustancias vasoactivas por las células endoteliales determinando la vasodilatación o la vasoconstricción respectivamente de arterias y arteriolas pulmonares. La activación o la inhibición de cascadas bioquímicas tisulares especialmente endoteliales podrían estar determinando la adaptación a esta condición (Ayón y Cueva, 1998).

La adaptación a la hipoxia de altura, produce un aumento de la frecuencia cardiaca submáxima y del gasto cardiaco submáximo. El volumen sistólico permanece igual o se reduce. De igual manera ocurre con la frecuencia cardiaca máxima o con el gasto cardiaco máximo. A largo plazo, la frecuencia cardiaca submáxima permanece elevada, el gasto cardiaco submáximo cae por debajo de los valores a nivel del mar, y disminuyen el volumen sistólico, la frecuencia cardiaca máxima y el gasto cardiaco máximo (Alexander, 1967; Faulkner 1967; Kalusen 1969).

La hipertensión arterial pulmonar que presenta está caracterizada por vasoconstricción arteriolar pulmonar, incremento de la viscosidad de la sangre debido a la policitemia y a la remodelación vascular. Algunos estudios, especialmente en ratas muestran que alteraciones en la producción y la activación de factores como el óxido nítrico (NO) y la endotelina (ET)-1, que responden a su vez a diversos estímulos relacionados con la patogénesis de la hipertensión arterial pulmonar, contribuyen significativamente al desarrollo de la enfermedad (Breslow *et al.*, 1993; Brady *et al.*, 2002).

En condiciones de hipoxia hipobárica se producen modificaciones hematológicas importantes como aumento de la secreción de eritropoyetina, del hematocrito y hemoglobina. Asimismo se produce un aumento de la viscosidad sanguínea, y un desplazamiento de la curva de disociación de la oxihemoglobina hacia la derecha.

La coagulación está también alterada, con aumento del fibrinógeno, disminución de la actividad fibrinolítica, y secuestro de plaquetas en el tejido pulmonar (Abbredcht 1972; Reynafarje 1964).

La hipoxia activa la producción del factor inductor de hipoxia-1 (HIF-1), y de la inducción del gen que produce Egr-1 (respuesta de crecimiento temprano), quienes tienen la capacidad de modular la expresión de genes que participan en la remodelación de la matriz extracelular y del propio músculo liso y en el desencadenamiento de la hipertensión arterial pulmonar en respuesta a la hipoxia pulmonar (Yu *et al.*, 1998; Semenza, 2000; Yan *et al.*, 2000).

En condiciones hipobáricas agudas (3 días) se observan cambios físico químicos en el parénquima pulmonar y en las estructuras que constituyen el sistema surfactante. Predominantemente hay delaminación del neumocito tipo 2, cambios edematosos, daños a nivel de la lamina basal y acumulación de macrófagos alveolares. En condiciones crónicas (30 días) va a predominar la reparación proliferativa; los cambios del sistema surfactante están acompañados por acumulación de granulocitos y monocitos en el lecho vascular (Sulkowska *et al.*, 1997).

La hipoxia hipobarica está asociada con numerosos cambios de tipo humoral, nutricional y respiratorio tal como el incremento de las necesidades de oxígeno a nivel de músculos respiratorios, el cual resulta en significativas

adaptaciones bioquímicas e histológicas de los músculos asociados a la respiración, en particular del diafragma.

## **2.2 Óxido Nítrico**

El NO es un gas simple formado por un átomo de oxígeno y uno de nitrógeno. Tiene un peso molecular de 30,006 mol, una densidad relativa de 1,036 a 21 °C, un volumen específico de 0,81 m<sup>3</sup>/Kg., una temperatura de ebullición de – 151,8 °C con una pureza mínima de 98,5%. y es considerada como una sustancia venenosa de clase A. Es una sustancia termodinámicamente inestable a temperatura ambiente, en estado gaseoso no tiene tendencia a formar dímeros mientras que en estado líquido forma dímeros y es de color azul. Es una sustancia altamente tóxica (Ignarro, 1989; Adams, 1994; Rubin, 1996).

El NO tiene un electrón desapareado en su órbita externa, esto es la base para su actividad biológica actúa como un radical libre en la interacción electroquímica entre el NO y los metales. Sin embargo, su reactividad como radical libre, es muy débil (Ignarro *et al.*, 1989). Esta pobre reactividad combinada con su liposolubilidad le permiten ser marcadamente difusible (Vaughn *et al.*, 1998). En vivo, esta difusión puede ser en gran parte regulada por su reacción con la hemoglobina (Liu *et al.*, 1998).

Las especies que reaccionan con el NO son realmente limitadas, básicamente son el oxígeno, metales de transición y otros radicales como el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ).

Las investigaciones preliminares en la que se demostró que el endotelio vascular produce una sustancia con efectos vasodilatadores, la cual en principio se denominó factor relajante derivado del endotelio (EDRF) (Furchgott y Zawadzki, 1980), así como su identificación como NO (Ignarro *et al.*, 1987) marcaron el inicio de la era farmacológica de esta sustancia.

El NO se forma a partir de L-arginina por la actividad enzimática de la óxido nítrico sintasa (NOS) que pertenece a la familia de las óxido reductasas, las cuales son homólogas de la reductasa citocromo P<sub>450</sub> con la obtención de L-citrulina como coproducto (Fig. 1). En dicha reacción una molécula de L-arginina es transportada al interior de la célula endotelial por un transportador específico, generándose una molécula de L-citrulina y una molécula de NO; todo esto es catalizado por la enzima NOS (Schmidt *et al.*, 1988; Stamler *et al.*, 1992; Adams, 1994; Murray *et al.*, 1996; Rubin, 1996; Pozo *et al.*, 1998).

La producción de NO por las células requiere la presencia de una o más isoformas reconocidas hasta ahora. Se han identificado tres isoformas de NOS que producen NO a través de la vía común de la L arginina: isoforma

neuronal o tipo I (nNOS), inducible o tipo II (iNOS) y endotelial o tipo III (eNOS) (Moncada *et al*, 1997; Schmidt *et al*, 1998) (Fig. 2).

Las isoformas endotelial (eNOS) y neural (nNOS) son calcio dependientes (cNOS), están presentes en diferentes tejidos como células endoteliales, neuronas, neuroglías y otros en donde producen concentraciones fisiológicas de ON al actuar como señalizadores moleculares (Dimiski, 1994; Moncada *et al.*, 1997; Pozo *et al.*, 1998; Qu *et al.*, 1999).

La isoforma inducible (iNOS) o tipo II es calcio independiente, esta presente en diferentes tipos celulares como macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, músculo liso y en el endotelio en respuesta a diferentes estímulos inmunológicos tales como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-  $\alpha$ ) y al lipopolisacárido bacteriano (LPS), los cuales generan gran cantidad de NO que puede ser tóxico en células tumorales o infectadas por virus. El conocimiento de esta amplia distribución de las NOS ayudan a explicar algunos de los efectos en el organismo asociados con la liberación del NO.

El NO una vez formado puede difundirse hacia las células subyacentes, donde activa a la enzima guanidilciclase (Gc) la cual provoca vasodilatación, inhibición plaquetaria y aumento intracelular de GMPc, que es el mediador de los efectos fisiológicos (Lamas *et al.*, 1992; Dimiski, 1994; Moncada *et al.*, 1997; Carcillo, 1999; Qu *et al.*, 1999).

El NO endotelial es un vasodilatador endógeno potente que juega un rol importante en la regulación de la resistencia vascular pulmonar y sistémica (Fig. 2). Además de su papel central como vasodilatador, inhibe la adherencia de las células sanguíneas circulantes (plaquetas y leucocitos) y suprime la proliferación de las células musculares lisas vasculares; por consiguiente, la reducción de la actividad del NO endotelial estaría asociada a la vasoconstricción, trombosis, inflamación y crecimiento vascular anormal en enfermedades cardiovasculares (Cooke y Dzau, 1997).

De manera natural, el NO reacciona con diversas moléculas formando nitritos y nitratos, metabolitos estables y solubles los cuales se utilizan como método indirecto para la valoración bioquímica de la producción de ON en extractos de tejidos, orina, plasma o en suero (Bories *et al.*, 1995; Taskiran *et al.*, 1997).

La síntesis y producción del NO es regulada por glucocorticoides y agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES), así también esta regulado a través de mecanismos de retroalimentación negativa (Garthwaite, 1993; Mc Donald y Murad, 1996).

### **2.3 Oxido Nítrico y su relación en la Hipoxia**

El NO participa en una amplia gama de procesos biológicos, dentro de los cuales tenemos, diferentes mecanismos de activación de factores de transcripción, translocación de los mRNA, metabolismo del hierro,



mutagénesis, apoptosis, glicólisis y el transporte de electrones mitocondriales, acilación de proteínas, síntesis de desoxinucleótidos, fusión de mioblastos, adhesión de las plaquetas y neutrófilos, proliferación de promotores de células mieloides, producción de células T, queratinocitos y células tumorales, liberación de hormonas pituitarias, regulación del tono bronquial y el de los esfínteres, regulación del peristaltismo esofágico, contracción del estómago e intestino, útero y corazón y la erección del pene. Participan en la tolerancia y toxicidad a opioides, en la regulación de la memoria, del sueño y de la presión sanguínea (Moncada *et al.*, 1991; Knowles *et al.*, 1992, Lowenstein *et al.*, 1994).

El efecto vasodilatador del NO es estimulado por diferentes factores entre los que se encuentran: la hipoxia y el flujo sanguíneo (Alfonso *et al.*, 1997, Levesque *et al.*, 1994, Yamasigawa y Kurihara, 1988).

La exposición a la hipoxia de moderada intensidad produce incremento transitorio de  $Ca^{++}$  intracelular activando la síntesis de eNOS (Hampl *et al.*, 1995).

Rabinovich *et al* describió que la inhibición crónica de NOS no conduce al desarrollo de hipertensión pulmonar, posiblemente debido a una disminución del volumen cardiaco. Estas discrepancias se han tratado en estudios recientes usando ratones que son deficientes en isoformas de NOS.

En el pulmón encontramos las tres isoformas de NOS siendo la principal la eNOS que se encuentra en la vasculatura pulmonar (Archer *et al.*, 1989); por otro lado la iNOS se expresa en el epitelio de las vías aéreas y en el músculo liso de las vías aérea y de los vasos sanguíneos (Voelkel, 1986; Dinh-Xuan, 1993), mientras que la nNOS se expresa en el tejido nervioso bronquial fino del epitelio pulmonar (Voelkel, 1986; Palmer *et al.*, 1987; Archer *et al.*, 1989; Moncada *et al.*, 1991).

Estudios realizados en ratones knockout para cada una de estas isoformas sugieren que el NO derivado de eNOS es importante en la modulación del tono vascular pulmonar basal, así como en la atenuación del desarrollo de la hipertensión pulmonar (Furchgott *et al.*, 1980; Fineman *et al.*, 1992; Hasunuma *et al.*, 1991).

Otros estudios realizados en las cadenas pesadas de miosina diafragmática de ratas sometidas a hipoxia crónica se ha encontrado una disminución en la expresión de la isoforma nNOS y un incremento en la expresión de la isoforma iNOS (Mortola y Naso, 1995).

Investigaciones recientes han demostrado la influencia de cortos periodos de hipoxia sobre la síntesis de NO y reportan cambios en la expresión del NOS, dependientes de la isoforma de NOS y del tipo de célula involucrada (Ishihara *et al.*, 1995).

Los estudios sobre la influencia de los períodos de hipoxia (horas hacia las 3 semanas) en las isoformas constitutivas de NOS, revelaron resultados contradictorios dependiendo de la especie animal, duración de la hipoxia, tipo celular y el órgano implicado. Por ejemplo la exposición a hipoxia in vitro por 12 a 48 horas produjo una disminución en la expresión de eNOS en la célula endotelial pulmonar; mientras que hubo un incremento perceptible en la expresión eNOS en células endoteliales aórticas (Liao *et al.*, 1995; Arnett *et al.*, 1996).

Del mismo modo, la expresión de eNOS pulmonar fetal in vitro, disminuye significativamente después de 48 horas de exposición a hipoxia; mientras que la producción de NO epitelial bronquial es independiente de los niveles de presión de oxígeno (PO<sub>2</sub>) (North *et al.*, 1996).

La hipoxia hipóbarica se asocia al aumento de la actividad ventilatoria del músculo, debido a la disminución de la ventilación pulmonar, que da lugar a demandas metabólicas crecientes del músculo ventilatorio (Mortola y Naso, 1995). Los estudios anteriores indican que los períodos prolongados de actividad del músculo esquelético conducen a un aumento significativo en la expresión de nNOS (Reiser *et al.*, 1997).

La hipoxia hipóbarica causa remodelación vascular (músculo liso y replicación celular endotelial y acumulación extracelular de la matriz), que es mediado por los mitógenos vasculares de la célula y los factores del crecimiento tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF),

endotelina 1 y factor de crecimiento plaquetario. Estos mitógenos especialmente el VEGF estimulan la expresión de los eNOS en las células endoteliales (Kroll y Waltenberger, 1998).

Estudios en ratas demostraron que la exposición a una hipoxia hipóbarica de 12 a 24 horas produjo un aumento selectivo y significativo de la expresión del gen para nNOS, lo cual se expresa en un incremento en la producción de nNOS en neuronas centrales y periféricas (Guo *et al.*, 1997; Prabhakar *et al.*, 1998).

Esta demostrado que la disminución de la actividad del NO endotelial contribuye a la patogénesis de trastornos cardiovasculares como la arteriosclerosis, la estenosis valvular, injuria de perfusión e hipertensión pulmonar; y estos podrían ser revertidos mediante la administración de L-arginina que es un precursor del NO (Cooke y Dzau, 1997).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Lugar de Ejecución**

El presente estudio se realizó en la Estación Experimental del Instituto Veterinario de Investigaciones Tropicales y de Altura (C.I. IVITA) en el distrito de El Mantaro, provincia de Jauja, a una altura de 3 320 m.s.n.m. y en las instalaciones del Laboratorio de Farmacología y Toxicología Veterinaria, de la Facultad de Medicina Veterinaria - U.N.M.S.M, en la ciudad de Lima (a nivel del mar).

#### **3.2 Animales**

Ratas albinas línea Holtzman machos adultos, con pesos comprendidos entre (180 +/- 30 gramos) escogidos al azar. La mitad de ellos (grupo control) permaneció a nivel del mar, mientras que los demás (grupo hipoxia) fueron transportados a 3,320 m.s.n.m.

#### **3.3 Materiales**

##### Equipos para Medición:

Espectrofotómetro UV-VIR lab Med.

Balanza analítica Metler.

Balanza mecánica Ohaus.

##### Reactivos

Reactivo de Griess A: Ácido sulfanílico 1% en ácido fosfórico al 5 %.

Reactivo de Griess B: N -1- Naftiletildiamina al 0.1 % en agua destilada.

Hidróxido de sodio (NaOH) 1,0 M.

Sulfato de Zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) 30 %.

Zinc en polvo.

#### Material de laboratorio

Centrífuga Adams.

Alcohol.

Bandejas.

Pipetas de 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml.

Algodón.

Destilador de agua.

Estufa Aescular

Embudos plásticos.

Agua destilada.

Jeringas descartables de 3 ml.

Pentobarbital %

Matraz 250 ml.

Beaker 250 ml.

Gradillas.

Piceta.

Papel de filtro.

Gotero.

#### Material de cirugía

1 pinza simple.

1 tijera mayo recta.

Hojas de bisturí N° 21.

Material Diverso

Jaulas.

Viruta.

Bebederos.

Alimento comercial para roedores.

Cuaderno de notas.

Cinta pegafán.

### 3.4 Método Experimental

#### 3.4.1 Mantenimiento de los animales de experimentación

Durante el desarrollo de la parte experimental los animales fueron mantenidos en jaulas de metal, se les suministro alimento comercial desde el día 1 hasta el día de su sacrificio para la toma de muestra. La disposición de agua fue *ad libitum*.

#### 3.4.2 Selección y tratamiento de Animales

Se utilizaron 270 animales machos adultos, de los cuales 135 (grupo hipóxica) fueron sometidos entre 1 a 42 días de estrés hipóxico medioambiental (Fig. 2) a una altitud de 3 320 m.s.n.m. Los 135 animales restantes (grupo control) fueron mantenidos a nivel del mar (Fig. 1).

La distribución de animales se puede sumarizar en la siguiente tabla:

**TABLA 1.** DISTRIBUCIÓN DE RATAS PARA LA DETERMINACIÓN DE NO;  
SEGÚN DIAS DE EXPOSICION A HIPOXIA MEDIOAMBIENTAL.

Bloque No	Días y semanas de Muestreo	Grupo Control (nivel del mar)	Grupo Hipóxica (3320 m.s.n.m.)
I	1	15	15
II	2	15	15
III	5	15	15
IV	1 semana	15	15
V	2 semana	15	15
VI	3 semana	15	15
VII	4 semana	15	15
VIII	5 semana	15	15
IX	6 semana	15	15
TOTAL		135	135



### **3.4.3 Determinación de los niveles de Nitritos y Nitratos.**

#### **3.4.3.1 Método de Griess**

Este método se fundamenta en una reacción de diazotización. El reactivo de Griess usa sulfanilamida y dicloruro de N-1-nafiletilenediamina (NED) bajo condiciones ácidas (ácido fosfórico). Esta técnica detecta nitritos y nitratos los cuales son los dos principales productos estables del NO (Gallardo, 1999).

#### **3.4.3.2 Procedimiento.**

Se obtuvieron las muestras de sangre de 15 ratas del grupo control y 15 ratas del grupo hipoxia por decapitación (Fig. 4 y 5), los cuales fueron colocados en tubos de ensayo heparinizados. Las muestras se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 10 minutos, para la obtención de plasma, el cual fue desproteinizado utilizando  $ZnSO_4$  en medio alcalino. El NO fue cuantificado utilizando el método de Griess.

Las lecturas se hicieron en un Espectrofotómetro digital UV-VIR lab Med. a una longitud de onda de 520-550 nm, referidas a la absorvancia de soluciones de nitritos y nitratos de sodio.

### **3.5 Método Estadístico**

Para la evaluación estadística se utilizó un diseño de bloques aleatorios completos. Se determinó la diferencia de los niveles de NO por efecto del

tiempo de exposición para la cual se utilizó la prueba de Análisis de Varianza.

El test de Dunnet se usó para determinar en cual de los dos grupos se encuentra los niveles más altos de NO.

La prueba de comparación múltiple de medias o test de Tukey fue usada para determinar la relación tiempo de exposición y mayor concentración de NO.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores plasmáticos de Óxido Nítrico (NO) en los lotes control (nivel del mar) encontrados en ratas, están comprendidos entre  $2.851 \pm 1.517 \mu\text{m}$  y  $4.435 \pm 1.671 \mu\text{m}$  (Tabla N° 2). Mientras que los valores en ratas expuestas a hipoxia de altura están entre  $2.6883 \pm 0.832 \mu\text{m}$  y  $10.651 \pm 4.475 \mu\text{m}$ .

Los valores obtenidos a nivel del mar son similares entre ellos ( $p > 0.05$ ) lo cual indica que a nivel del mar no existieron factores que influenciaron en su variación.

Comparando los grupos controles con sus respectivos pares de grupo hipoxia, observamos que en el día 2 de exposición a la hipoxia hubo un incremento significativo de NO hasta de  $10.651 \pm 4.475 \mu\text{m}$ . Los valores descendieron hacia el quinto día,  $4.980 \pm 0.60 \mu\text{m}$  permaneciendo aún diferentes ( $p > 0.05$ ) a su par control; conforme pasaron los días, los valores se estabilizaron y se mantuvieron constantes hasta el día 42.

Estos datos sugieren que la exposición a la hipoxia estimula la síntesis de NO o un aumento en la utilización de NO almacenado; puesto que la hipoxia ambiental desarrolla hipoxia tisular, condición que produce una vasoconstricción arteriolar pulmonar, lo que estimula una mayor liberación de NO con finalidad compensatoria, tratando de restablecer el equilibrio general de oxigenación y perfusión pulmonar (Moncada *et al.*, 1991; O´Brij y Peacock, 1998).

Además la exposición a la hipoxia de moderada intensidad produce incremento del  $\text{Ca}^{++}$  intracelular activando la síntesis de eNOS (Hampl *et al.*, 1995).

Angulo *et al.* (2004) han encontrado que en pollos de carne BBs expuestos a la altura de 3320 m.s.m.n. (Huancayo) la mortalidad era significativa (20%) y los que quedaron vivos presentaron una sobreproducción de ON en comparación con los que fueron criados a nivel del mar; lo cual podría estar relacionado con el proceso de adaptación a la altura.

El mayor valor promedio, observado a corto tiempo (2 días) permite afirmar que los valores de óxido nítrico en ratas se elevan hacia el segundo día de exposición a la hipoxia (Esquema Nº 1 y Tabla Nº 2). Guo *et al.* (1997) y Prabhakar *et al.* (1998) demostraron que la exposición a una hipoxia hipóbarica de 12 a 24 horas produjo un aumento selectivo y significativo de la expresión del gen para nNOS, lo cual se expresa en un incremento en la producción de nNOS en neuronas centrales y periféricas, explicando lo manifestado. Jernigan *et al.*, han reportado que la hipoxia aguda incrementa los niveles de ROS y disminuye la vasodilatación pulmonar dependiente del NO en pulmones de ratas.

Furchgott *et al.* (1980), Fineman *et al.* (1992) y Hasunuma *et al.* (1991) sugieren que la modulación del tono vascular pulmonar basal, así como la

atenuación del desarrollo de la hipertensión pulmonar esta influenciado por el NO derivado de eNOS.

Los valores plasmáticos de NO elevados significativamente al día siguiente de su permanencia en Huancayo (Esquema 1) se correlacionan con lo encontrado por Manukhina *et al.* (1999) en ratas adultas, en estos animales los niveles de nitritos y nitratos se incrementaron por consiguiente los niveles de NO, lo cual estaría indicando un proceso adaptativo a la hipoxia, cuyos efectos benéficos pueden ser utilizados potencialmente en los procesos de aclimatación.

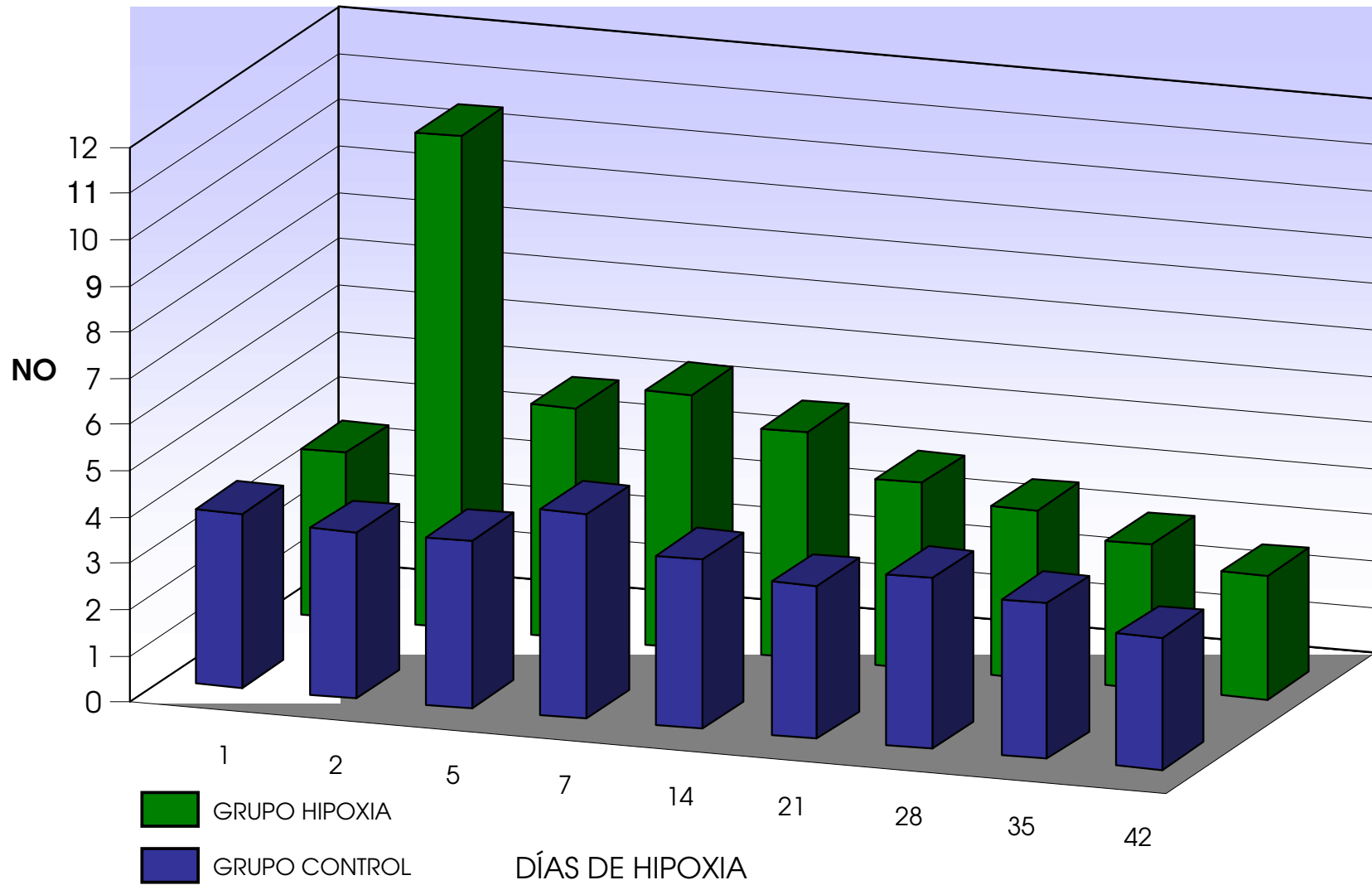
También se observó que los valores descendieron conforme la exposición a la hipoxia se prolonga (Esquema N° 1 y Tabla N° 2). Gonzalez y Wood (2001) encontraron que la aclimatización involucra la sobrerregulación de la sintasa del NO inducible (iNOS)) y han sugerido que la hipoxia produce una alteración en el balance ROS/NO lo cual es eventualmente restaurado durante el proceso de aclimatización.

**Tabla N° 2.** VALORES DE NO EN RATAS SOMETIDAS A HIPOXIA MEDIOAMBIENTAL COMPARADOS CON GRUPO CONTROL

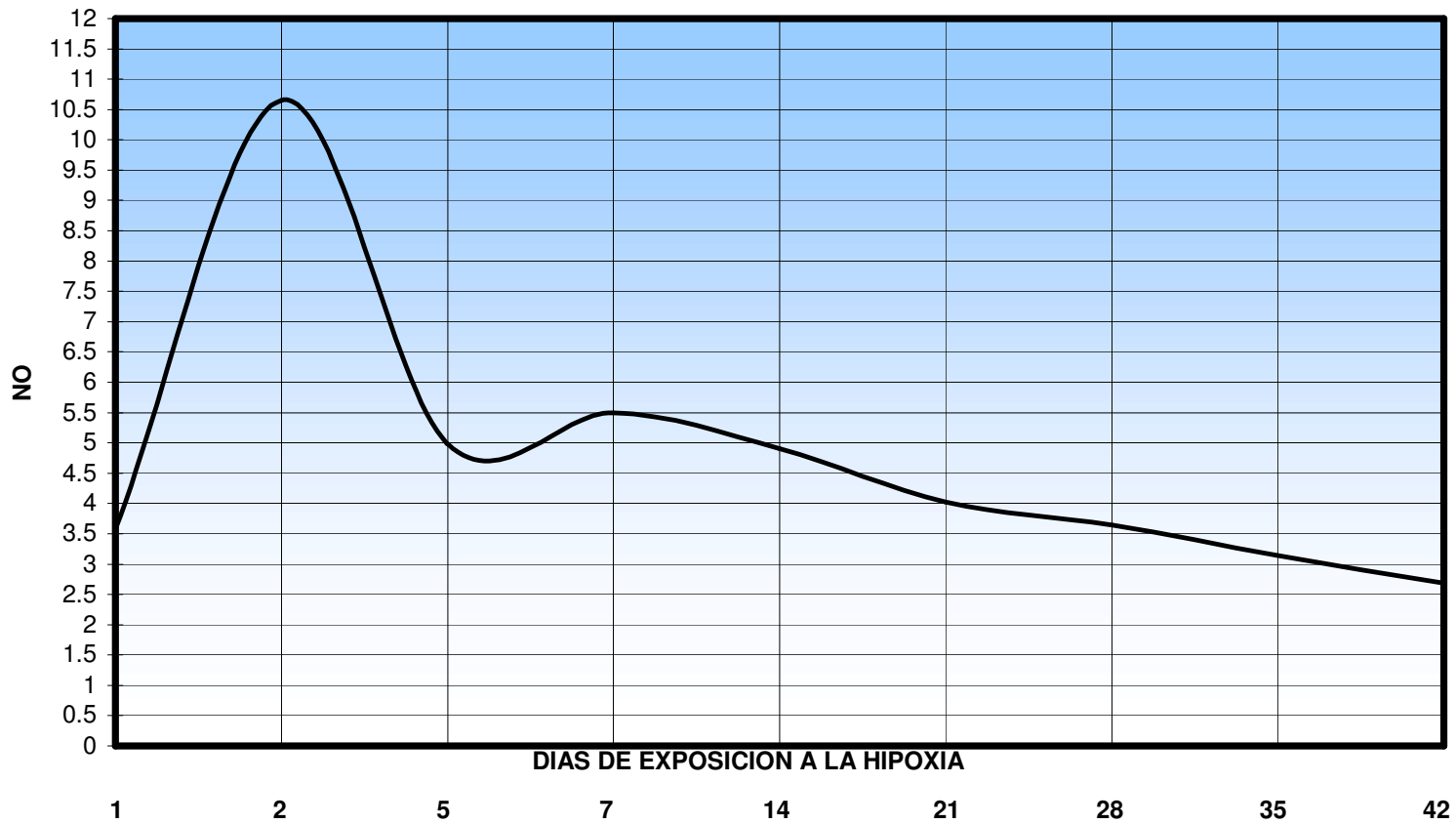
Días y Semanas de Muestreo	n	Control (Nivel del mar)	Hipóxia o Altura
		X Valor mMolar ± Ds	X Valor mMolar ± Ds
1 día	15	3.774 ± 1.860	3.575 ± 1.126
2 día	15	3.599 ± 0.702 *	10.651 ± 4.475 *
5 día	15	3.616 ± 1.462 *	4.980 ± 0.60 *
7 días	15	4.435 ± 1.671 *	5.50 ± 3.736 *
2 semana	15	3.646 ± 1.394	4.902 ± 2.722
3 semana	15	3.317 ± 1.35	4.026 ± 1.506
4 semana	15	3.694 ± 1.446	3.649 ± 0.813
5 semana	15	3.371 ± 1.376	3.138 ± 0.822
6 semana	15	2.851 ± 1.517	2.683 ± 0.832

(\*) Valores estadísticamente diferentes  $p < 0.05$

**Cuadro 1.** COMPARACION DE LOS VALORES DE NO ENTRE GRUPO HIPOXIA Y GRUPO CONTROL



**Esquema 1. VALORES DE NO EN RATAS SOMETIDAS A HIPOXIA MEDIOAMBIENTAL**





## **V. CONCLUSIONES**

1. Los niveles de NO en ratas al día 2 de exposición a la hipoxia fueron significativamente mayores ( $p < 0.05$ ) que a nivel del mar.
2. A mayor tiempo de exposición a la hipoxia los niveles de NO se normalizaron.
3. La sobreproducción de NO al segundo día representaría una respuesta adaptativa a la hipoxia medioambiental.

## VIII. LITERATURA CITADA

1. Abbredcht, P.H. 1972. Plasma erythropoietin in men and mice during acclimatization to different altitudes. *J Appl Physiol*; 32: 54.
2. Abraham A.S., J.M. Kay, R.B. Cole, A.C. Pincock. 1971. Hemodynamic and pathological study of the effect of chronic hypoxia and subsequent recovery of the heart and pulmonary vasculature of the rat. *Cardiovasc Res*; 5:95-102.
3. Adams, R. 1994. New frontiers in medicine: The discovery of endogenous nitric oxide. *PROC. 12th ACVIM*; 750-751.
4. Alexander J.K. 1967. Reduction of stroke volume during exercise in man following ascent to 3.100 m altitude. *J Appl Physiol*; 23: 849.
5. Alfonso J.P., Pérez M.D., Cordiés L., Pozo H.A. 1997. Nuevas teorías fisiopatogénicas en hipertensión arterial. *Acta Med*; 7 (1):36.
6. Angulo H.P., B.J.A. Espinoza, G.W. Flores, C.D. Díaz, S.A. Galarza y A.V.E. Fernández. 2003. Primer reporte sobre niveles elevados de nitritos en plasma de pollos de carne, un hallazgo trascendental.
7. Angulo H.P., B.J.A. Espinoza, A.V.E. Fernández, C.D. Díaz. 2004. Efecto del estrés medioambiental por altura en los niveles plasmáticos de óxido nítrico en pollos de carne. *MV Rev de Cien Vet*, 20(4): 3-7.

8. Angulo H.P., B.J.A. Espinoza, A.V.E. Fernández, C.D. Díaz. 2004. Estrés oxidativo y óxido nítrico en el mal de altura y la ascitis en pollos de carne: Una revisión y una hipótesis. *MV Rev de Cien Vet*, 21(1): 3-9.
9. Archer S.L., J.P. Tolins, L. Raij, E.K. Weir. 1989. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is enhanced by inhibition of the synthesis of an endothelium derived relaxing factor. *Biochem Biophys Res. Commun*; 164:1198-1205.
10. Arnet U.S., A. McMillan, J.L. Dinerman, B. Bellermann y C.J. Lowenstein. 1996. Regulation of endothelial nitric oxide synthase during hypoxia. *J Biol Chem*; 271: 15069-15073.
11. Ayón, M. y S. Cueva. 1998. Adaptación del ganado bovino a la altura. *Pub Téc FMV*; 38:15p.
12. Bailey DM, Davies B, Young I, Hullin MA, Seddon PS. 2001. A potential role for free radical-mediated skeletal muscle soreness in the pathology of acute mountain sickness. *Aviat Space Environ Med*, 72: 513-521.
13. Bories P.N. y C. Bories. 1995. Nitrate determination in biological fluids by an enzymatic one-step assay with nitrate reductase. *Clin Chem*; 41: 904-907.
14. Brady F., Bakhle Y.S., Bell C. 2002. Evaluation of the involvement of nitric oxide and substance P in reducing baroflex gain in the genetically hypertensive (GH) rat. *Acta Physiol Hung*. 89(4):451-61.

15. Breslow M.J., Tobin J.R., Bredt T.S., Ferris C.D., Snyder S.H., Traytsman R.J. 1993. Nitric oxide as a regulator of adrenal blood flow. *Am J Physiol.* 264(2 Pt 2): H464-9.
16. Burton R.R., Beach E.L., Smith A.H. 1968. Effect of chronic hypoxia on the pulmonary arterial blood pressure of the chicken. *Am J Physiol.* 214: 1438-1442.
17. Carcillo J. 1999. Nitric oxide production in neonatal and pediatric sepsis. *Crit Care Med*; 27: 1063-1065.
18. Chang S.W., Stelzner T.J., Dril J.V., Voelkel N.F. 1988. Hypoxia increases plasma glutathione disulfide in rats. *Lung*, 167: 269-276.
19. Chao W.H., Askew E.W., Roberts D.E., Wood S.M., Perkins J.B. 1999. Oxidative stress in humans during work at moderate altitude. *J Nutr*, 129: 2009-2012.
20. Cooke J.P. y V.J. Dzau. 1997. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginina and cardiovascular diseases. *Circulation*; 96: 379-382.
21. Cueva Moreno S., Sillau H., Valenzuela A., Ploog H. 1974. High altitude induce pulmonary hypertension and right heart failure in broiler chicken. *Res Vet Sci.* 10: 370-374.
22. Dimiski, D. 1994. Nitric oxide: Gastrointestinal disease. *PROC. 12th ACVIM*; 756-759.

23. Faulkner J.A. 1967. Effects of training at moderate altitude on physical performance capacity. *J Appl Physiol*; 24: 685.
24. Fineman J.R., M.A. Heymann, S.J. Soifer. 1991. NW-nitro-L-arginine attenuates endothelium-dependent pulmonary vasodilation in lambs. *Am J Physiol*. 260:H299-H306.
25. Fineman J.R., R. Chang, S.J. Soifer. 1992. EDRF inhibition augments pulmonary hypertension in intact newborn lambs. *Am J Physiol*; 262:H1365-H1371.
26. Furchgott R.F. y J.V. Zawadzki. 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*; 288:373-376.
27. Gallardo M.J.M.. 1999. Oxido Nítrico: Método de Griess. Laboratorio de Toxicología CIBIOR – IMSS.
28. Garthwaite J. 1993. Nitric oxide signaling in the nervous system. *Sem Neurosci*; 5:171-80.
29. Gaspar T. 1969. Evaluación de la incidencia de la mortalidad por mal de altura en vacunos de la sierra del Perú. Tesis de bachillerato. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
30. Giesbrecht G.G. 1995. The respiratory system in a cold environment. *Aviat Space Environ Med*; 66 (9): 890 – 902.

31. Gonzalez N.C. y J.G Wood. 2001. Leukocyte-endothelial interactions in environmental hypoxia. *Advanced Experimental Medicine and Biology*, 502: 39-60.
32. Grover R.F., Reeves J.T., Blount S.G., Jr. 1963. Pulmonary vasoconstriction in steers at high altitude. *J Appl Physiol*. 18: 567-574.
33. Guo, Y., M.E. Ward, S. Beasjourns, M. Mori, y S.N.A. Hussain. 1997. Regulation of cerebellar nitric oxide production in response to prolonged in-vivo hypoxia. *J Neurosci Res*; 49: 89-97.
34. Hampl V., y Herget J. 2000. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol. Rev*. 80: 1337-1372.
35. Hasunuma K., T. Yamaguchi, D.M. Rodman, R.F. O'Brien, I.F. McMurtry. 1991. Effects of inhibitors of EDRF and EDHF on vasoreactivity of perfused rat lungs. *Am J Physiol*; 260:L97-L104.
36. Hislop A. y L.M. Reid. 1977. Formation of the pulmonary vasculature. In: Hodson WA, ed. *Development of the Lung*. New York, Marcel Dekker; 37-86.
37. Hoshikawa Y., Ono S., Suzuki S., *et al*. 2001. Generation of oxidative stress contributes to the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia. *J Appl Physiol*, 90: 1299-1306.
38. Ignarro L.J., G.M. Buga, K.S. Wood, R.E. Byrns y G. Chaudhuri. 1987. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Nat. Acad. Sci.USA*; 84:9265-9269
39. Ignarro L.J. 1989. Endothelium-derived nitric oxide: action and properties. *FASEB*; 3: 31.

40. Ishihara A., K. Itoh, Y. Oishi, C. Hirofuji and H. Hayashi. 1995. Effects of hypobaric hypoxia on histochemical fibre-type composition and myosin heavy chain isoform component in the rat soleus muscle. *Pflügers Arch*; 429: 601-606.
41. Jeringan N.L., T.C. Resta, B.R. Walker. 2004. Contribution of oxygen radicals to altered NO-dependent pulmonary vasodilation in acute and chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286: L947-L955.
42. Johns R.A., Linden J.M., Peach M.J. 1989. Endothelium-depend relaxation and cyclic GMP accumulation in rabbit pulmonary artery are selectively impaired by moderate hypoxia. *Circ Res*. 65: 1508-1515.
43. Klausen K. 1966. Effects of high altitude on maximal working capacity. *J Appl Physiol*; 21: 1191.
44. Klausen K. 1969. Exercise under hypoxic conditions. *Med Sci Sports* 143.
45. Knowles R.G, y S. Moncada. 1992. Nitric oxide as a signal in blood vessels. *Trends in Biol Sci*; 399-402.
46. Kourembanas S., T. Morita y Y. Liu. 1997. Mecanismos by which oxygen regulates gene expression and cell-cell interaction in the vasculature. *Kidney Int*; 51(2):438-43.
47. Kroll J. y J. Waltenberger. 1998. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2. *Biochem Biophys Res Commun*; 252: 743-746.

48. Kuida H., A.M. Brown, J.L. Thorne, R.L. Lange, H.H. Hecht. 1962. Pulmonary response to acute hypoxia in normal, unanesthetized calves. *Am J Physiol*; 2013 (2): 391 – 396.
49. Lamas S., P.A. Marsden, Li G.K., P. Tempst, T. Michel. 1992. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*; 89: 6348-6352.
50. Le Cras T.D., C. Xue, A. Rengasamy, R.A. Johns. 1996. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol*.
51. Levesque H., Cailleux N., Courtois H. 1994. Peptide vasoactif d'origine endothéliale. Perspectives thérapeutiques. *Presse Med*; 23: 1172 - 7.
52. Liao J.K., J.J. Zulueta, F.S. Yu, H.B. Peng, C.G. Cote y P.M. Hassoun. 1995. Regulation of bovine endothelial constitutive nitric oxide synthase by oxygen. *J Clin Invest* 96: 2661-2666.
53. Liu X., M.J.S. Miller, M. Joshi, H. Sadowska-Krowicka, D.A. Clark y J.R. Lancaster. 1998. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem*, 273: 18709-18713.
54. Lowenstein C.H., J.L. Dinerman, S.H. Syner. 1994. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med*, 120: 227.
55. Malyshev, I., Manukhina, E.B. Stress, adaptation and nitric oxide (review). 1998. *Biochemistry* 63: 992-1006.



56. Malyshev I.Y., T.A. Zenina, L.Y. Golubeva, V.A. Saltykova, E.B. Manukhina, V.D. Mikoyan, L.N. Kubrina, A.F. Vanin. 1999. NO-dependent mechanisms of adaptation to hypoxia. *Nitric Oxide*, 3(5): 393-401.
57. Manukhina E.B., I.Y. Malyshev, B.V. Smirin, S.Y. Mashina, V.A. Saltykova, A.F. Vanin. 1999. Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia. *Nitric Oxide*, 3(5):393-401.
58. Marin J., M.A. Rodriguez-Marinez. 1997. Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther* 75:111-134.
59. Mc Donald L.J., F. Murad. 1996. Nitric oxide and cyclic GMP signalin. *Proc Soc Biol Med*.211(1):1-6.
60. Miranda K.M., M.G. Espey y D.A. Wink. 2001. A rapid simple spectrophometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*; 5(1), 62-71.
61. Moller P., Loft S., Lundby C., Olsen N.V. 2001. Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative damage in humans. *FASEB J*, 15: 1181-1186.
62. Moncada S., R.M.J. Palmer, E.A. Higgs. 1991. Nitric Oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*; 43: 109-142.
63. Moncada S., A. Higgs y R. Furchgott. 1997. XIV International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol. Rev*; 49(2):137-142.

64. Moncada S. 1997. Getting to NO you Odyssey.;3:47-51.
65. Moncada S., R.M.J. Palmer, E.A. Higgs. 1991. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*; 43: 109-142.
66. Mortola J., y L. Naso. 1995. Electrophoretic analysis of contractile proteins of the diaphragm in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 269: L371-L376.
67. Murray R.K., D.K. Granner, P.A. Mayes, V. Rodwell. 1996. *Harpers. Biochemistry*. 24 ed. Stamford: Prentice Hall International; 286:87.
68. Nakanishi K., Tajima F., Nakamura A., *et al.* 1994. Effects of hypobaric hypoxia on antioxidants enzymes in rats. *J Physiol*, 489: 869-876.
69. North A.J., K.S. Lau, T.S. Brannon, L.C. Wu, L.B. Wells, Z. German y P.W. Shaul. 1996. Oxygen upregulates nitric oxide synthase gene expression in ovine fetal pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 270; L643-L649.
70. O´Brij S.O. y A.J. Peacock. 1998. Cellular responses to hypoxia in the pulmonary circulation. *Thorax*; 53:1075-1079.
71. Ohshima H. y H. Bartsch. 1994. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis *Mutant. Res*; 305: 235-264.

72. Olander H.J., Burton R.R., Adler H.E. 1967. The pathophysiology of chronic hypoxia in chickens. *Avian Dis.* 11: 609-620.
73. Palmer R.M.J., A.G. Ferrige, S. Moncada. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*; 327:524-526.
74. Pinsky D.J., S.F. Yan, Y. Naka, J.X. Chen, E.S. Conolly, D.M. Stern. 1995. Hypoxia and modification of the endothelium: implications for regulation of vascular homeostatic properties. *Semin Cell Biol*; 6: 283-294.
75. Pizarro B., Salas A., Paredes J. 1970. Mal de altura en aves. IV Boletín Extraordinario del IVITA, UNMSM. 4: 147-151.
76. Pfeiffer J.M., Askew E.W., Roberts D.E., *et al.* 1999. Effect of antioxidant supplementation on urine and blood markers of oxidative stress during extended moderate altitude training. *Wild Environ Med*, 10: 66-74.
77. Prabhakar N.R., S.F. Pieramici, D.R. Premkumar, G.K. Kumar y R.N. Kalaria. 1998. Activation of nitric oxide synthase gene expression by hypoxia in central and peripheral neurons. *Brain Res Mol Brain Res*; 43: 341-346.
78. Pozo D. *et al.* 1998. Producción de óxido nítrico y su modulación en el sistema inmune y el sistema nervioso. *Arch Neurocienc (Mex)*. 2: 84-94.
79. Qu X. *et al.* 1999. Roles of nitric oxide synthases in platelet-activating factor-induced intestinal necrosis in rats. *Crit Care Med*; 27: 356-364.

80. Rabinovich M., W. Gamble, A.S. Nadas, O.S. Miettinen, R. Reid. 1979. Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol*; 236:H818-H827.
81. Radestits O., C. Gay, D. Blood, K. Hinchcliff. 2002. Tratado de las Enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino caprino y equino. Vol II. 1860-1862
82. Reiser P.J., W.O. Kline y P.L. Vaghy. 1997. Induction of neuronal type nitric oxide synthase in skeletal muscle by chronic electrical stimulation in vivo. *J Appl Physiol*; 82: 1250-1255.
83. Reynafarje C. 1964. Hematologic changes during rest and physical activity in man at high altitude. In: *The Physiological Effects of High Altitude*. De. W.H. Weinhw. New York. MacMillan.
84. Rokitzki L., Logeman L., Sagredos A.N., *et al.* 1994. Lipid peroxidation and antioxidants vitamins under extreme endurance stress. *Acta Physiol Scand*, 151: 149-158.
85. Rubin G. 1996. Endogenous and exogenous nitric oxide donors. *Comp. Cont. Educ*; 639-645.
86. Schmidt H.H.H.W., H. Nau, W. Wittfoht, J. Gerlach, K.E. Prescher, M.M. Klein. 1988. Arginine is the physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol*; 154:213-216.

87. Schmidt M.C., Askew E.W., Roberts D.E., *et al.* 2002. Oxidative stress in individuals training in a cold moderate altitude environment and their response to a phytochemical antioxidant supplement. *Wild Environ Med*, 13: 94-105.
88. Stamler J.S., D.J. Singel, J. Loscalzo. 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox- activated forms. *Science*; 258:1898-1901.
89. Sulkowska M. 1997. Morphological studies of the lungs in chronic hypobaric hypoxia. *Pol J Pathol*; 48(4):225-234.
90. Taskiran D., F.Z. Kutay, E. Sozmen, S. Pögün. 1997. Sex differences in nitrite/nitrate levels and antioxidant defence in rat brain. *Neuroreport*; 8: 881-884.
91. Teng G. y G.R. Barer. 1995. In vitro responses of lung arteries to acute hypoxia after NO synthase blockade or chronic hypoxia . *J Appl Physiol*; 79(3): 763-770.
92. Vaughn M.W., L. Kuo, J.L. Liao. 1998. Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation. *Heart Circ Physiol*; 43: H1705-H1714.
93. Vasankari T.J., Kujala U.M., Rusko H., Sarma S. 1997. The effect of endurance exercise at moderate altitude on serum lipid peroxidation and antioxidative function in humans. *Eur J Appl Physiol*, 75: 396-399.
94. Voelkel N.F. 1986. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am Rev Respir Dis*;133:1186-1195.

95. Widimsky J., Urbanova D., Ressler J., Ostadal B., Pelouch V., Prochazka J. 1973. Effect of intermittent altitude hypoxia on the myocardium and lesser circulation in the rat. *Cardiovasc Res.* 7: 798-808.
96. Will J.A; E. G. Bisgard. 1975. Comparative hemodynamic of domestic animals at high altitude. *Prog. Res.* 9:138 – 43.
97. Will D.H., Alexander A.F., Reeves J.T., Grover R.F. 1962. High altitude induced pulmonary hypertension in normal cattle. *Circulation Res.* 10:172-177.
98. Wink D.A., J.F. Darbyshire, R.W. Nims, J.E. Saavedra. Ford PC. Reactions of the bioregulatory.
99. Yamasigawa M., Kurihara H. 1988. Novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*; 40: 1-12.
100. Yu A.Y., M.G. Frid, L.A. Shimoda, C.M. Wiener, K. Stenmark, G.L. Semenza. 1998. Temporal, spatial and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am J Physiol*; 275:L818-L826.
101. Zhao L., Crawley D.E., Hughes J.M.B., Evans T.W., Winter R.J.D. 1993. Endothelium-derived relaxing factor activity in rat lung during hypoxic pulmonary vascular remodeling. *J Appl Physiol.* 74: 1061-1065.



**Foto 1.** Ratas control a nivel del mar.



**Foto 2.** Ratas sometidas a hipoxia medioambiental.

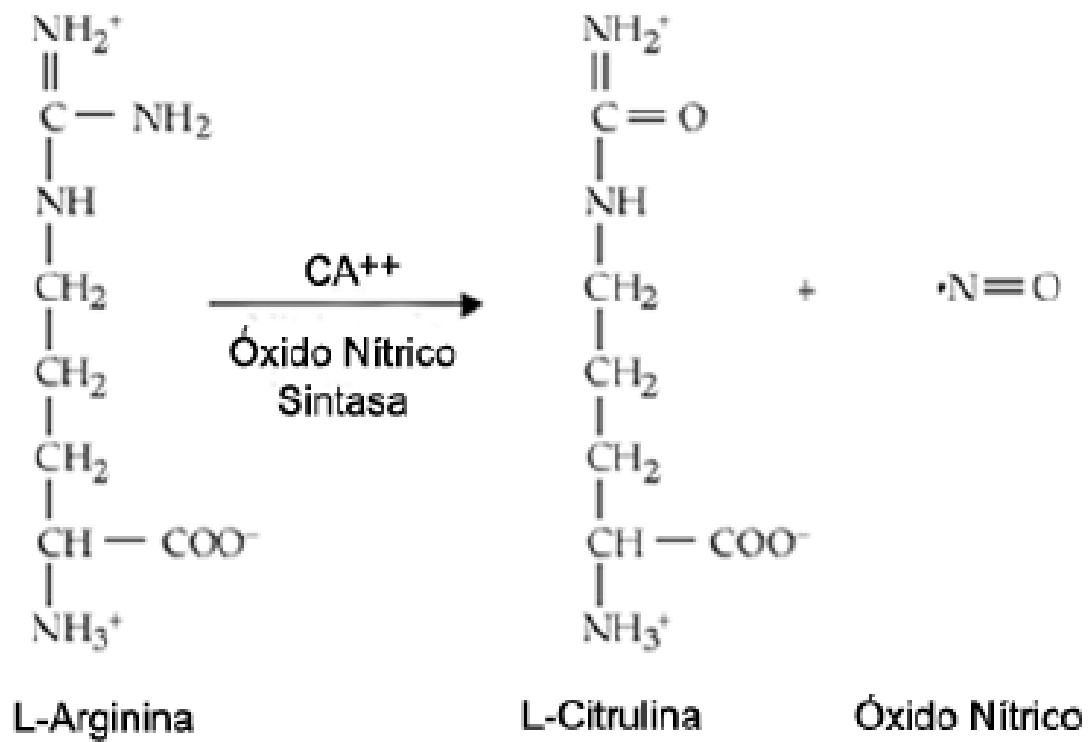


**Foto 3.** Toma de muestra. Huancayo

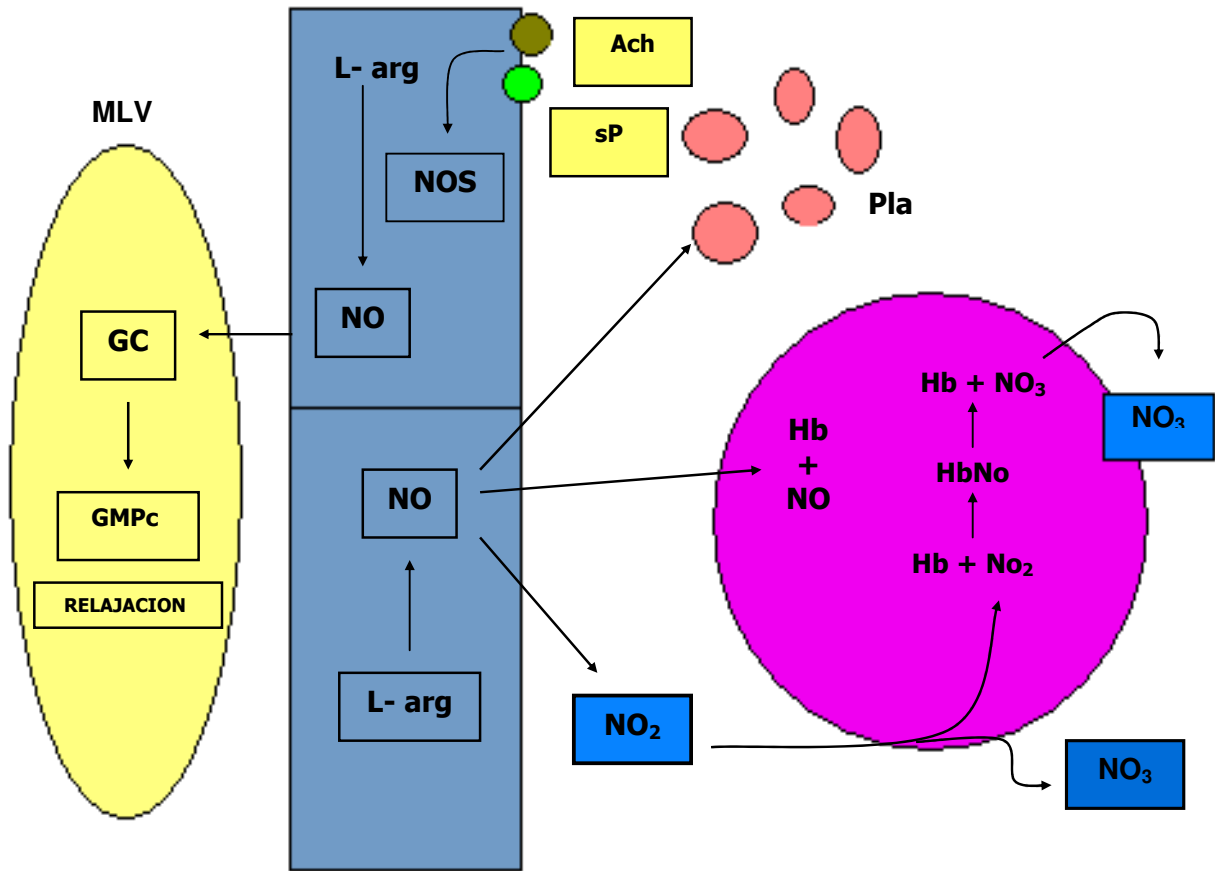


**Foto 4.** Toma de muestra. Huancayo.





**Figura 1.** Síntesis del óxido nítrico, a partir de la L-Arginina



MVL: músculo liso vascular. Pla: Plaquetas. Gr: Glóbulos Rojos

● Receptor de Ach

● Receptor de sustancia P

**Figura 2.** Difusión del ON desde el endotelio al músculo liso adyacente, sangre y un al grupo

Heme o su metabolización en nitritos y nitratos.