



Universidad de Valladolid



PROGRAMA DE DOCTORADO EN
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TESIS DOCTORAL:

**Efectos inducidos por la hipoxia crónica intermitente
en rata y cobaya como modelos animales de
la apnea obstructiva del sueño**

Presentada por María Inmaculada Docio Cuadrado
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dra. Asunción Rocher Martín

Dr. Jesús Prieto Lloret

Índice

1	Abreviaturas	11
2	Introducción	17
2.1	La importancia del oxígeno	17
2.2	La hipoxia	19
2.2.1	Clasificación de la hipoxia	19
2.2.2	La hipoxia respiratoria	20
2.2.3	Respuestas adaptativas a la hipoxia	21
2.3	Sensores de oxígeno: El cuerpo carotídeo (CC)	27
2.3.1	Organización estructural y funcional	27
2.3.2	Fisiología del CC	30
2.3.3	Fisiopatología del CC	38
2.3.4	El caso especial del cobaya: Hipofuncionalidad del CC	39
2.4	La apnea obstructiva del sueño (AOS) y el síndrome de apnea hipopnea del sueño (SAHS)	41
2.4.1	Definición de AOS y SAHS.....	43
2.4.2	Epidemiología y factores de riesgo del SAHS	46
2.4.3	Diagnóstico y tratamiento del SAHS	47
2.5	Fisiopatología del SAHS: Importancia de la hipoxia crónica intermitente (HCI)	49
2.5.1	Mecanismos dependientes de la activación del reflejo quimiorreceptor: El papel del CC en los efectos de la HCI.....	51
2.5.2	Mecanismos independientes de la activación del reflejo quimiorreceptor: Disfunción del endotelio vascular	57
2.6	El envejecimiento como protección de los efectos de la HCI	63
3	Hipótesis y objetivos	67
4	Material y métodos	71
4.1	Modelos animales y diseño experimental	71
4.1.1	Procedimientos con animales sin anestésicos.....	74
4.1.2	Procedimientos quirúrgicos con animales anestesiados	75
4.2	Medida de parámetros respiratorios	76
4.2.1	Gasometría y pH en sangre arterial durante el ciclo de HCI	76
4.2.2	Pletismografía	77

4.3 Medida de la respuesta del cuerpo carotídeo.....	79
4.3.1 Estudio morfológico e identificación de CQ	79
4.3.2 Contenido endógeno y síntesis de catecolaminas.....	81
4.3.3 Secreción de catecolaminas.....	82
4.3.4 Medida de Ca ²⁺ citosólico en CQ con Fura-2AM	84
4.4 Parámetros relacionados con la actividad simpática	85
4.4.1 Contenido de catecolaminas en plasma	85
4.4.2 Contenido y síntesis de catecolaminas en otros tejidos	86
4.4.3 Secreción de catecolaminas por la médula adrenal	86
4.5 Medida de la presión arterial sistémica	87
4.6 Medida de la presión arterial pulmonar	88
4.7 Medida del Índice de Fulton	89
4.8 Medida de la respuesta vascular: Miografía	89
4.9 Estudio morfológico vascular: Tinción tricrómico de Masson	90
4.10 Determinaciones plasmáticas.....	91
4.10.1 Determinación de nitritos.....	91
4.10.2 Determinación de L-arginina y sus metabolitos	91
4.10.3 Determinación de angiotensina II, endotelina-1, factor de crecimiento endotelial vascular, péptido natriurético atrial y eritropoyetina.	92
4.11 Medida del estrés oxidativo mitocondrial: Aconitasa/Fumarasa.....	93
4.12 Medida del nivel de inflamación: Factor nuclear kappa B.....	94
4.13 Análisis de datos.....	95
5 Resultados.....	99
Capítulo I. Estudio de los efectos de la HCl en Rata 3M vs. 20M	99
5.1 Efecto de la HCl en el peso corporal	99
5.2 Gasometría y pH en sangre arterial durante el ciclo de HCl	100
5.3 Parámetros respiratorios y consumo de O₂	102
5.4 Respuesta del cuerpo carotídeo tras la exposición a HCl	106
5.4.1 Síntesis de catecolaminas y secreción ante un estímulo hipóxico	106
5.4.2 Medida de Ca ²⁺ citosólico en células quimiorreceptoras	108

5.5 Actividad cardiovascular tras la exposición a HCl	109
5.5.1 Efecto sobre la presión arterial sistémica	109
5.5.2 Frecuencia cardíaca	110
5.6 Respuesta vasomotora de la carótida tras la exposición a HCl	110
5.7 Morfología de la arteria carótida.....	112
5.8 Biodisponibilidad del óxido nítrico	114
5.8.1 Nitritos y nitratos en plasma	114
5.8.2 Arginina y derivados metilados en plasma	115
5.9 Angiotensina II plasmática.....	116
5.10 Papel de la dopamina en los efectos de la HCl	117
5.10.1 Efecto crónico de la domperidona sobre la PAS	118
5.10.2 Efecto agudo de la domperidona sobre la PAS	119
5.11 Efectos pulmonares de la HCl	119
5.11.1 Efecto de la HCl sobre la presión arterial pulmonar	119
5.11.2 Respuestas vasculares de la arteria pulmonar tras la HCl.....	120
5.11.3 Morfología de la arteria pulmonar.....	122
Capítulo II. El cobaya como modelo para el estudio de los efectos de la HCl..	123
5.12 Evolución y efecto de la HCl en el peso corporal	123
5.13 Efecto de la HCl sobre distintos parámetros sanguíneos.....	124
5.14 Parámetros respiratorios y consumo de O₂	125
5.15 Respuesta del cuerpo carotídeo tras la exposición a HCl	128
5.15.1 Análisis morfológico e inmunocitoquímico.....	129
5.15.2 Contenido de catecolaminas endógenas.....	130
5.15.3 Respuesta secretora a la hipoxia y al alto K ⁺	131
5.15.4 Medida de Ca ²⁺ citosólico en células quimiorreceptoras	131
5.16 Medida de la actividad simpática: parámetros relacionados.....	132
5.16.1 Contenido de catecolaminas endógenas en distintos tejidos	132
5.16.2 Glucemia basal.....	134
5.16.3 Secreción de catecolaminas endógenas de la médula adrenal.....	134
5.17 Actividad cardiovascular tras la exposición a HCl	136
5.17.1 Efecto sobre la presión arterial sistémica	136
5.17.2 Frecuencia cardíaca e Índice de Fulton.....	137

5.18 Efecto sobre la vasoconstricción pulmonar hipóxica	138
5.19 Respuestas vasculares tras la exposición a HCl	139
5.19.1 Arteria carótida	139
5.19.2 Arteria pulmonar	141
5.20 Morfología de la arteria carótida y pulmonar tras la HCl.....	143
5.21 Factores vasoactivos en la regulación de la presión arterial.....	145
5.21.1 Factores endoteliales: NO, ET-1 y VEGF	146
5.21.2 Factores hormonales: AII y ANP.....	148
5.22 Marcadores de estrés oxidativo e inflamación.....	149
6 <i>Discusión</i>.....	153
6.1 Consideraciones generales de los modelos animales de HCl.....	155
6.2 Respuesta ventilatoria y metabólica	157
6.3 Funcionalidad del cuerpo carotídeo.....	160
6.4 Actividad simpática, respuesta cardiovascular y pulmonar	163
6.5 Función vascular.....	169
7 <i>Conclusiones</i>	177
8 <i>Bibliografía</i>	181

Abreviaturas

1 **ABREVIATURAS**

³H-CA: Catecolaminas marcadas con tritio

³H-Tyr: 3'5 Tirosina marcada con tritio

5-HT: Serotonina

All: Angiotensina II

A2aR: Receptor de adenosina de alta afinidad

Ach: Acetilcolina

ACN: Acetonitrilo

ADP: Adenosina-5-difosfato

ADMA: Dimetil arginina asimétrica (del inglés *Asymmetric Dimethylarginine*)

AM: Acetoximetiléster

AMP: Adenosina monofosfato

AMPK: Proteína kinasa activada por AMP (del inglés *AMP-activated protein kinase*)

ANP: Péptido natriurético atrial (del inglés *Atrial Natriuretic Peptide*)

AOS: Apnea obstructiva del sueño

AR: Arteria renal

ATP: Adenosina trifosfato

BCBA: Ablación bilateral del cuerpo carotídeo (del inglés *Bilateral Carotid Body Ablation*)

BCSD: Denervación bilateral del seno carotídeo (del inglés *Bilateral Carotid Sinus Denervation*)

BSA: Seroalbúmina bovina

CA: Catecolaminas

CaO₂: Contenido de O₂ arterial

CC: Cuerpo carotídeo

CAT: Transportador de arginina

COX-2: Ciclooxygenasa-2

CPAP: Presión positiva continua en la vía aérea (del inglés *Continuous Positive Airway Pressure*)

CQ: Células quimiorreceptoras

CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (del inglés *cAMP-response Element-binding Protein*)

CSE: Cystathionine γ -lyase

DA: Dopamina

DDAH: Dimetilarginina dimetilamina hidrolasa

DE: Disfunción endotelial
DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO: Dimetilsulfóxido
DTT: Ditioneitol
DOPAC: Ácido acético dihidroxifenil
E: Epinefrina
ECE: Conversor de preproendotelina
EDTA: Ácido etildiaminotetraacético
EEG: Electroencefalograma
ELISA: Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
EMG: Electromiograma
eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial (del inglés *endothelial Nitric Oxide Synthases*)
EPO: Eritropoyetina
EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERK: Proteínas Kinasas reguladas por señales extracelulares (del inglés *Extracellular signal-Regulated Kinases*)
ET-1: Endotelina 1
FC: Frecuencia cardíaca
FIH: Factor inhibidor de HIF
FiO₂: Fracción de oxígeno inspirado
FR: Frecuencia respiratoria
GCS: Ganglio cervical superior
GLUT-1: Transportador de glutamato 1
GRD: Grupo respiratorio dorsal
GRV: Grupo respiratorio ventral
HA: Hipoxia aguda
Hb: Hemoglobina
HC: Hipoxia crónica
HCI: Hipoxia crónica intermitente
HCS: Hipoxia crónica sostenida
HI: Hipoxia intermitente
HIF: Factor inducible por hipoxia (del inglés *Hypoxia-Inducible Factors*)
HO: Hemooxigenasa
HPLC-ED: Cromatografía líquida de alta resolución-detección electroquímica (del inglés *High Performance Liquid chromatography with Electrochemical Detection*)
HRP: Peroxidasa de rábano (del inglés *Horseradish Peroxidase*)

HTA: Hipertensión arterial
IAH: Índice de apnea hipopnea
IL-1 β : Interleuquina 1 β
IL-6: Interleuquina 6
IMC: Índice de masa corporal
iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible (del inglés *inducible Nitric Oxide Synthases*)
i.p.: Intraperitoneal
JNK: Proteínas Kinasas c-Jun N-terminal (del inglés *c-Jun N-terminal kinases*)
KPSS: Solución salina fisiológica de 80mM de K⁺ (del inglés *high potassium phosphate-buffered saline solution*)
L-NAME: NG-nitro-L-arginina metilester
L-PAG: L-proparglicina
LTI: Laboratorio de técnicas instrumentales
MA: Médula adrenal
MAP-K: Proteínas kinasas activadas por mitógenos (del inglés *Mitogen Activated Protein Kinases*)
MeOH: Metanol
MMA: Monometil arginina
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NE: Norepinefrina
NF-kB: Factor Nuclear Kappa B
nNOS: Óxido nítrico sintasa neuronal (del inglés *neuronal Nitric Oxide Synthases*)
NOS: Óxido nítrico sintasa (del inglés *Nitric Oxide Synthases*)
NOX-2: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa-2
NSC: Nervio del seno carotídeo
NTS: Núcleo del tracto solitario
OPA: Orto-ftalaldehído
OSS: ácido 1-octanosulfónico sal sódica
OxLDL: Lipoproteína de baja densidad oxidadas
PA: Potencial de acción
PaCO₂: Presión parcial de dióxido de carbono en sangre arterial
PaO₂: Presión parcial de oxígeno en sangre arterial
PAP: Presión arterial pulmonar
PAS: Presión arterial sistémica
PB: Presión barométrica
PBS: Buffer fosfato salino
PCA: Ácido perclórico

- PCR:** Proteína C reactiva
- PE:** Fenilefrina
- PHD:** Proteínas proilhidroxilasas
- PI3-K:** Fosfatidilinositol-3-kinasa (del inglés *Phosphatidylinositol 3 kinase*)
- PRMT:** Proteína arginina metiltransferasa (del inglés *Protein Arginine Methyltransferases*)
- PSG:** Polisomnografía
- RAS:** Sistema renina angiotensina (del inglés *Renin–Angiotensin System*)
- REM:** Movimientos oculares rápidos (del inglés *Rapid Eye Movements*)
- ROS:** Especies reactivas de oxígeno (del inglés *Reactive Oxygen Species*)
- RVH:** Respuesta ventilatoria hipóxica
- RVHC:** Respuesta ventilatoria hipercápnica
- RVLM:** Bulbo rostral ventrolateral (del inglés *Rostral Ventrolateral Medulla*)
- SAHS:** Síndrome de apnea hipopnea del sueño
- SDMA:** Dimetil arginina simétrica (del inglés *Symmetric DiMethylArginine*)
- SDS:** Sodio dodecilsulfato
- SEM:** Error estándar de la media (del inglés *Standard Error of the Mean*)
- SHR:** Ratas hipertensas espontáneas (del inglés *Spontaneously Hypertensive Rat*)
- sLTF:** Facilitación sensorial a largo plazo (del inglés *sensory Long-Term Facilitation*)
- SNA:** Sistema nervioso autónomo
- SNC:** Sistema nervioso central
- SNS:** Sistema nervioso simpático
- SOD:** Superóxido dismutasa
- St. HbO₂:** Saturación de la oxihemoglobina
- TASK:** canal de K⁺ sensible al ácido (del inglés *Twik-related acid-sensitive K⁺ channel*)
- TFA:** Ácido trifluoroacético (del inglés *TriFluoroAcetic acid*)
- TH:** Tirosina hidroxilasa
- TNF α :** Factor de necrosis tumoral- α (del inglés *Tumor Necrosis Factor- α*)
- VAS:** Vía aérea superior
- VC:** Volumen corriente
- VD:** Ventrículo derecho
- VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*)
- VI+S:** Ventrículo izquierdo más el septum
- VM:** Volumen minuto
- VPH:** Vasoconstricción pulmonar hipóxica
- XO:** Xantina oxidasa

Introducción

2 INTRODUCCIÓN

2.1 La importancia del oxígeno

La llegada del oxígeno (O₂) a la atmósfera, hace 2000 millones de años, se debió a la aparición de las cianobacterias que lo generaban a través del proceso de la fotosíntesis oxigénica. Al mismo tiempo, aparecieron las primeras células eucariotas alterando el curso de la evolución, dando lugar al desarrollo de la vida aeróbica con la formación de las mitocondrias por endosimbiosis con proteobacterias. La adaptación hacia la respiración aeróbica se produjo debido a las ventajas que tiene el O₂ favoreciendo un mayor aprovechamiento de la energía procedente de los nutrientes a través de la fosforilación oxidativa mitocondrial. En la glucólisis anaeróbica por cada molécula de glucosa se obtienen 2 moléculas de adenosina trifosfato (ATP); mientras que en la fosforilación oxidativa, que ocurre íntegramente en las mitocondrias a través del ciclo de Krebs en la cadena respiratoria, los electrones son transferidos para unirse al oxígeno y como consecuencia de este transporte se produce un potencial transmembrana que hace que se sinteticen 38 moléculas de ATP mediante la ATP sintasa. Sin embargo, este proceso genera electrones que no continúan por la cadena respiratoria, los cuales se escapan uniéndose a moléculas de oxígeno y generando radicales libres de O₂, haciendo del mismo un elemento perjudicial para la célula.

El mantenimiento de la homeostasis del O₂ en el organismo es imprescindible para la vida. Para que exista un balance entre el aporte de O₂ y el consumo del mismo en los tejidos, los organismos poseen ciertas herramientas fisiológicas capaces de la captación, el transporte y la liberación del O₂ a las células. El O₂ puede llegar al organismo por difusión, como ocurre en los organismos simples, o a través de un sistema sofisticado, como ocurre en los organismos superiores con estructuras especializadas como los pulmones y el sistema cardiovascular. Además, la coordinación de estos elementos complejos requiere de otras estructuras para la detección y respuesta ante la disminución del nivel de O₂ como son el cuerpo carotídeo (CC), las arterias pulmonares o los cuerpos neuroepiteliales de las vías aéreas¹. En la especie humana gracias a la respiración se produce el paso del O₂ desde la atmósfera a los tejidos, proceso en el que intervienen el aparato respiratorio y el circulatorio. Este proceso consiste en el aporte de aire a los alvéolos, donde se lleva a cabo la difusión del O₂ a la sangre y su unión a la hemoglobina (Hb), transportándose por los capilares sistémicos del organismo. La disociación del O₂ unido a la Hb y su difusión en el medio interno lo hacen accesible a las células.

El aire seco a nivel del mar presenta una presión barométrica (PB) de 760mmHg y la presión parcial de oxígeno (PO₂) en el mismo es la PB del aire por la fracción de oxígeno inspirado (FiO₂; 20.9%) igual a 160mmHg (760mmHg x 0.21). En altitud, la PB disminuye y como consecuencia la PO₂ también, a pesar de que el porcentaje de O₂ sigue siendo de 20.9%. Por ejemplo, la PB del aire en el Monte Everest, con una elevación de 8.848 metros, es de 251mmHg equivalentes a una PO₂ de 53mmHg. La exposición a PO₂ por debajo de la del nivel del mar estimula cambios fisiológicos para mantener en los tejidos el aporte de O₂. Los cambios afectan a los sistemas respiratorio, cardiovascular y metabólico para compensar la baja disponibilidad de O₂².

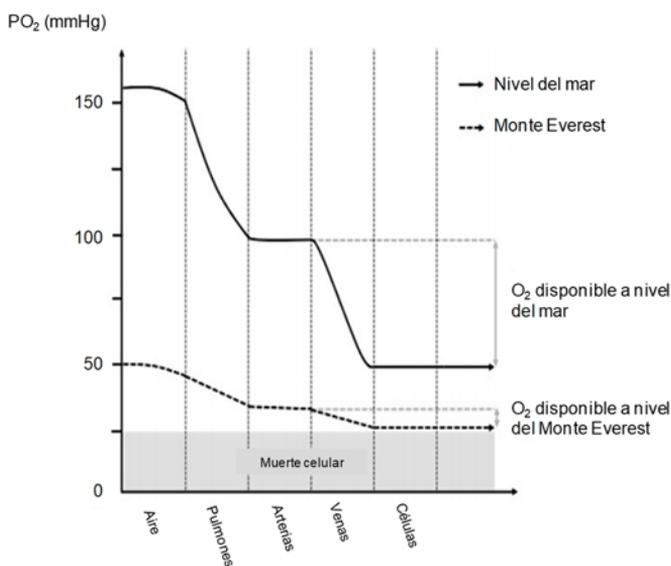


Figura 1. Descenso de la presión parcial de oxígeno (PO₂) desde el aire ambiente hasta las células, a nivel del mar (línea continua) y del Monte Everest (línea discontinua) (Modificado ref. ³).

En la vía aérea superior (VAS) el vapor de agua unido al aire inspirado, con una presión de 47mmHg a 37°C, hace que la PO₂ del aire inhalado se vea ligeramente disminuida por su paso a través de la tráquea (0.21 x (760 - 47)) llegando a ser de 150mmHg. Sin embargo, a nivel del alvéolo presenta una disminución de PO₂ llegando a 110mmHg (**Figura 1**). Por otro lado, el O₂ en cada tejido no es el mismo, como tampoco lo es la tolerancia a PO₂ por debajo de lo normal. Por ejemplo, el cerebro tiene una PO₂ de ~34mmHg y no tolera PO₂ menores, mientras que el músculo esquelético, que tiene una PO₂ alrededor de ~29mmHg, puede soportar PO₂ más bajas que el estado de reposo. La heterogeneidad en la PO₂ entre los tejidos se debe a la vascularización, la difusión tisular y al consumo específico de O₂ de las células característico de cada zona del cuerpo para un ajuste correcto de las necesidades de O₂⁴.

2.2 La hipoxia

Las células del cuerpo humano dependen del O₂ para la utilización de la energía y, por tanto, el aporte suficiente de O₂ es crítico para la supervivencia. Este puede verse alterado por factores patológicos, como son la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y la apnea del sueño, o ambientales, por cambios de altitud. Si el suministro de O₂ no es suficiente hablamos de hipoxia. La hipoxia es un estado fisiológico o fisiopatológico que se define como el déficit de O₂ en los tejidos de un organismo.

2.2.1 Clasificación de la hipoxia

Los tipos de hipoxia que se explican a continuación se agrupan de acuerdo con el origen del déficit de O₂: sistema cardiovascular, respiratorio, sangre o células del tejido⁵.

Hipoxia por estasis: Se refiere a situaciones en las que el flujo sanguíneo es anormalmente bajo (hipoperfusión) como ocurre en estado de shock o de síncope. El defecto en el flujo sanguíneo reside en el sistema cardiovascular y puede ser local (perfusión isquémica) o sistémico (gasto cardíaco reducido).

Hipoxia hipóxica: Ocurre cuando cae la PO₂ de la sangre arterial (PaO₂), es decir, la concentración de O₂ arterial es menor de lo normal. Se puede deber a dos circunstancias: que la PO₂ inspirado sea más baja que la normal (gran altitud) o podría ser un problema respiratorio (hipoventilación, mala difusión por edema pulmonar, falta de coincidencia ventilación-perfusión...). Se debe a la disminución de la oxigenación de la sangre arterial (hipoxemia) y, por lo tanto, el problema está en el sistema respiratorio.

Hipoxia anémica: Se produce por disminución de la capacidad de oxigenación de la sangre. Este defecto se asocia específicamente con la sangre e implica que hay menos moléculas de Hb (o sitios de unión a O₂) disponibles para unirse al O₂. Las causas pueden ser: disminución del hematocrito o anemia, cuando la concentración de Hb dentro de los glóbulos rojos disminuye, o intoxicación por monóxido de carbono (CO), debido a la unión irreversible de CO con algunos sitios del grupo hemo de la Hb haciendo imposible la unión con el O₂.

Hipoxia histotóxica: Se refiere a una reducción en la producción de ATP por las mitocondrias debido a un defecto en el uso del O₂. Por ejemplo, el envenenamiento por cianuro produce una disminución acusada en el consumo de O₂ en el tejido, ya que, bloquea la reacción del O₂ con la enzima citocromo c oxidasa (complejo IV).

2.2.2 La hipoxia respiratoria

La hipoxia respiratoria se define como una disminución en el contenido de O₂ inspiratorio causando un estado de déficit en el aporte de O₂ en la sangre y en último término en los tejidos corporales. La hipoxia respiratoria puede ser **hipobárica**, que consiste en una disminución de la PO₂ causada por una disminución natural (altitudes relativamente elevadas) o artificial (cámaras hipobáricas de bajas presiones) de la PB del aire; o **normobárica**, debida a una baja concentración de O₂ en el aire inspirado a una PB normal, esta se puede generar bajando la FiO₂ mediante la adición de N₂ o aire sin O₂ en una cámara parcialmente sellada.

En función de la exposición a la hipoxia destacan:

Hipoxia aguda (HA): La HA se define como exposición puntual a la hipoxia de forma rápida y durante un corto periodo de tiempo (minutos, horas).

Hipoxia crónica (HC): La HC ocurre cuando la exposición a la hipoxia se prolonga en el tiempo (días, meses, años). Cuando la hipoxia es fisiológica, es decir, causada por disminución de la PO₂ atmosférico, los individuos pueden vivir sin originar patologías, sin embargo, la falta de adaptación puede conducir a complicaciones muy graves⁶. Se da en poblaciones que viven normalmente en altitudes elevadas (Andes, Himalaya...). La HC, además, puede aparecer como consecuencia de una patología crónica, como en la EPOC.

Hipoxia intermitente (HI): La HI se define como el tiempo de exposición a hipoxia, durante minutos, horas o días, seguido de exposición a un ambiente normóxico y que, además, se repite varias veces. De modo que el individuo sufre episodios repetidos de hipoxia mezclados con episodios de normoxia⁷. Dependiendo de la duración de los episodios de hipoxia, esta puede ser aguda o crónica. La exposición a hipoxia crónica intermitente (HCI) la padecen las personas que no viven siempre a grandes alturas, sino que se trasladan a estas por un tiempo determinado y luego vuelven a nivel del mar, manteniéndose esta condición en el tiempo. La HCI también es característica en patologías como la apnea obstructiva del sueño (AOS) donde se producen episodios de hipoxia durante el sueño generados por obstrucciones en la vía aérea de manera intermitente, y el resto del día cursa con ambiente normóxico.

2.2.3 Respuestas adaptativas a la hipoxia

La hipoxia es un potente estímulo que inicia una serie de respuestas fisiológicas, algunas de ellas comienzan inmediatamente, y se reajustan continuamente durante la exposición a la misma⁸. En la especie humana y otros mamíferos responden a la hipoxia con una serie de respuestas adaptativas (**Figura 2**) a nivel sistémico, tisular y celular, para el mantenimiento de la homeostasis del O_2 y evitar problemas metabólicos⁹.

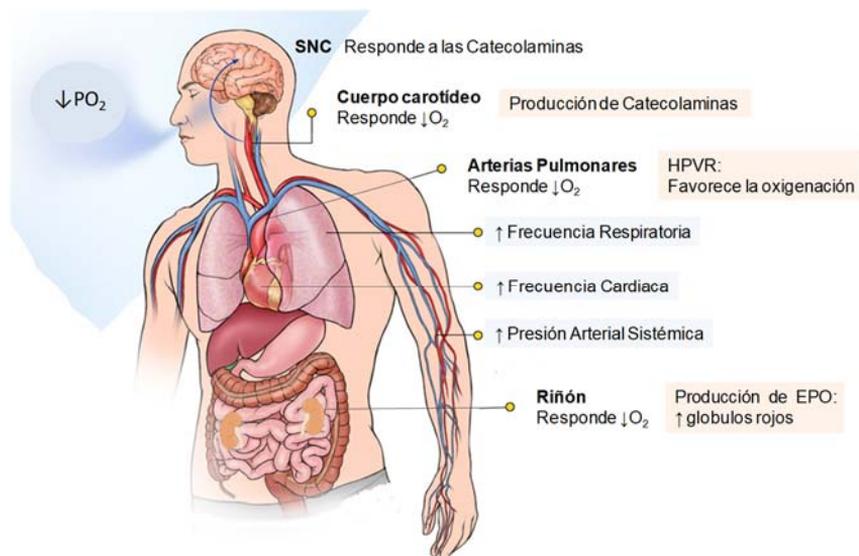


Figura 2. Resumen de los procesos fisiológicos regulados por la hipoxia. PO_2 , Presión parcial de O_2 ; SNC, Sistema Nervioso Central; CA, Catecolaminas; VPH, Vasoconstricción Pulmonar Hipóxica; EPO, Eritropoyetina.

Respuesta respiratoria y cardiovascular

La ventilación y la circulación representan los pasos clave que permiten a los individuos responder rápidamente a los cambios en el aporte y la demanda de O_2 . Debido a que el tiempo de circulación sanguínea desde los pulmones a la arteria carótida es aproximadamente de 6 segundos en reposo, más corto que a las áreas centrales, la disminución de la PaO_2 en sangre es detectada por primera vez por los quimiorreceptores de los CC activando el reflejo quimiorreceptor como respuesta a la hipoxia¹⁰ (**Figura 3**). Las alteraciones posteriores del control respiratorio en el sistema nervioso central (SNC), causadas por la activación del reflejo quimiorreceptor, proporcionan la "primera defensa" contra la hipoxia dando lugar al aumento del volumen minuto (VM) inspiratorio. Este fenómeno es conocido como respuesta ventilatoria hipóxica (RVH)¹¹.

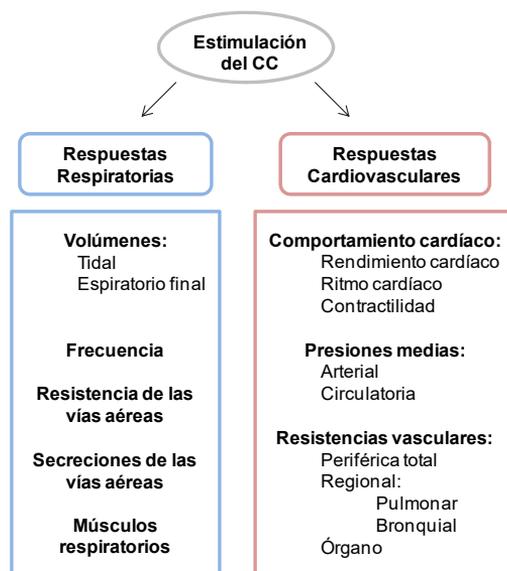


Figura 3. Respuestas adaptativas respiratorias y cardiovasculares inducidas por la estimulación del cuerpo carotídeo (CC) ante un estímulo hipóxico (Modificado ref. ¹²).

El VM elevado produce un aumento de la PO_2 alveolar y, además, causa alcalosis respiratoria debida a un aumento en la exhalación de dióxido de carbono (CO_2) que conduce a una presión alveolar de CO_2 menor y, por lo tanto, a una baja presión parcial de CO_2 en sangre arterial ($PaCO_2$). En un intento de compensar la reducción de $PaCO_2$ y H^+ la reabsorción renal de bicarbonato (HCO_3^-) disminuye, con el resultado de una mayor excreción de HCO_3^- ¹³. Sin embargo, al permanecer el VM elevado, la activación de los quimiorreceptores periféricos y centrales al CO_2 aumenta durante las primeras horas y días de aclimatación a la hipoxia, por lo que esta alcalosis respiratoria no atenúa de manera aguda el estímulo de hiperventilación ¹³. Por lo tanto, se mantiene la estimulación del centro respiratorio, denominada respuesta ventilatoria hipercápnic (RVHC) ¹⁴. El CC actúa como quimiorreceptor periférico principal, responsable parcialmente de la hiperventilación observada en la acidosis respiratoria ^{15,16}.

Otra respuesta casi inmediata al estímulo hipóxico es la respuesta de la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH). Las células musculares lisas de las arterias pulmonares detectan la hipoxia alveolar y al activarse se contraen. El resultado de esto es una redirección del flujo sanguíneo a las áreas de los pulmones mejor oxigenadas para permitir una mayor perfusión, como ocurre en pacientes que padecen EPOC ¹⁷. Sin embargo, cuando todo el tracto respiratorio es hipóxico, lo que ocurre a gran altura, se produce un aumento general de la resistencia vascular pulmonar, provocando hipertensión pulmonar ¹⁸. Esto, en combinación con una mayor actividad simpática que

produce un aumento del gasto cardíaco y de la presión arterial sistémica (PAS), permite un mejor flujo sanguíneo y, por lo tanto, un mejor aporte de O_2 a los tejidos¹⁹. Sin embargo, frente a exposiciones de hipoxia crónica se requieren otras adaptaciones para aumentar el contenido de O_2 arterial (CaO_2).

Mecanismos dependientes de HIF

Los factores inducibles por la hipoxia (HIF) son factores de transcripción que responden a cambios en la PO_2 . En presencia de O_2 , el factor inducible por hipoxia α (HIF α) es sometido a una rápida hidroxilación proteasomal por proteínas prolihdroxilasas (PHD) y aspargilhidroxilasa (factor inhibidor de HIF, FIH); ambas implican reacciones enzimáticas dependientes de O_2 . La hidroxilación mediada por PHD produce un sitio para la unión de la proteína Von Hippel-Lindau (VHL), que facilita la ubiquitinación y la degradación de HIF α . En niveles intermedios de hipoxia, la hidroxilación por FIH evita la interacción de HIF α con el coactivador transcripcional CREB. De modo que la ubiquitinación y degradación de HIF α se ve inhibida por la hipoxia²⁰. En este caso, HIF α se estabiliza y se dimeriza con el factor inducible por la hipoxia β (HIF β) expresado de manera constitutiva, para formar la proteína heterodimérica promoviendo la expresión de una multitud de genes, incluidos los que codifican el transportador de glucosa 1 (GLUT-1), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la eritropoyetina (EPO)²¹ (**Figura 4**). De manera que la actividad sostenida de HIF durante períodos de hipoxia da como resultado una serie de respuestas adaptativas que mejoran el suministro y la utilización del O_2 ²⁰.

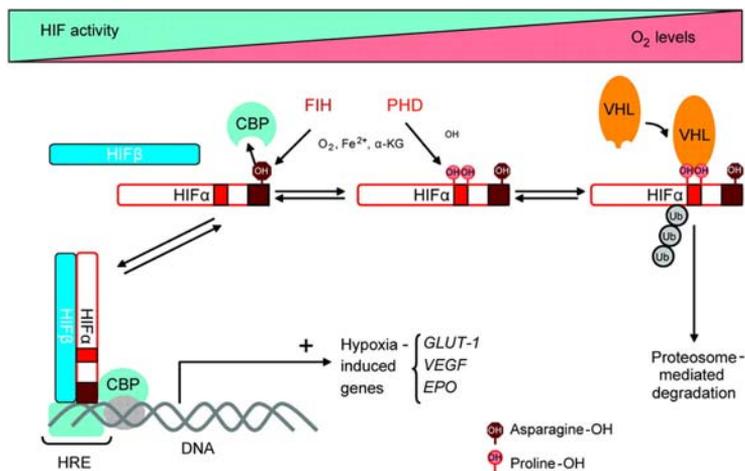


Figura 4. Mecanismo de detección de O_2 y la actividad de HIF a nivel celular (Tomado ref. ²²).

En casos de hipoxia, asumiendo que no hay disminución en el requerimiento de O₂ renal y que el flujo sanguíneo renal es constante, la disminución del CaO₂ causa una disminución en la PO₂ en el riñón²³. Este estado hipóxico inmediatamente produce la activación de HIF, y como resultado aumenta la síntesis y liberación de la hormona EPO por las células de la corteza renal²⁴. Esto causa aumentos detectables en la concentración de EPO sanguíneas a los 90-120 minutos de exposición a hipoxia²⁵, alcanza su punto máximo dentro de las 24-48 horas, y luego disminuye²⁶. Los riñones son los productores predominantes de EPO durante la edad adulta, aunque el hígado también sintetiza EPO durante el desarrollo fetal²⁵ y en hipoxia extrema²⁷. El aumento de EPO circulante promueve la eritropoyesis favoreciendo el acúmulo de glóbulos rojos para una mayor oxigenación.

Por otro lado, la hipoxia favorece la expansión de la red de capilares o angiogénesis para mejorar el intercambio entre la sangre y el tejido. Se cree que la sobreexpresión de HIF activa múltiples genes que codifican factores de crecimiento angiogénicos y citoquinas, como el VEGF²¹.

Cuando se trata de hipoxia local se inducen genes implicados en el metabolismo de la glucosa^{28,29}. Así, la activación de HIF aumenta la expresión de los transportadores de glucosa y de los enzimas glicolíticos favoreciendo el metabolismo anaerobio, de esta manera continua el aporte de energía compensando la falta de la formación de ATP mitocondrial por la ausencia de O₂.

Mecanismos independientes de HIF

Existen otros mecanismos sensibles a los cambios en los niveles de O₂ celular y que no dependen de HIF como son: la activación de distintas cascadas de Kinasas como la ruta de las MAP-K^{30,31}, las kinasas activadas por estrés (JNK y p38)^{32,33} o la ruta de las PI3 Kinasas³⁴; activación de los canales iónicos^{35,36} como los canales de K⁺ de las células quimiorreceptoras (CQ) del CC; los enzimas dependientes de O₂ como la hemooxigenasa (HO)³⁷ o la óxido nítrico sintasa (NOS)³⁸; o las especies reactivas de oxígeno (ROS), que actúan como transductores de señales y pueden estar reguladas en función del O₂ disponible ya que este es su componente principal.

Respuesta en poblaciones de gran altura

Para comprender las numerosas adaptaciones fisiológicas resultantes de la hipoxia, es importante considerar cómo las poblaciones de gran altura se han adaptado para compensar el estrés crónico de vivir en ambientes hipóxicos hipobáricos. Las personas que hoy en día viven en las tierras altas tibetana y andina (3.500-4.500 metros) son

descendientes de colonizadores que llegaron hace más de 25.000 y 11.000 años, respectivamente. Curiosamente, se han adaptado al estrés hipóxico a través de diferentes mecanismos, considerado un "experimento natural" para los investigadores³⁹.

La principal similitud es que tanto los nativos tibetanos como los andinos tienen tasas metabólicas basales normales, lo que implica que sus adaptaciones funcionales no requieren un mayor coste de O₂⁴⁰. Sin embargo, en comparación con los andinos, los tibetanos tienen tasas de ventilación en reposo elevadas y una respuesta mayor a las fluctuaciones de O₂, observado en una mayor RVH³⁹. Para compensar, la concentración de Hb de los individuos andinos es significativamente mayor que la de los tibetanos (19.2g/dL frente a 15.6g/dL, respectivamente)⁴¹. Un andino tiene una CaO₂, analizado a 4.000m, de ~0,24mLO₂/mL sangre, que es más alta que para los nativos de gran altitud que viven a nivel del mar (~0,21mLO₂/mL). Aun teniendo en cuenta el aumento de la ventilación del tibetano, la CaO₂ sigue siendo baja (~0,19mLO₂/mL), ya que ni la saturación de O₂ ni la Hb son más altas que en los nativos tibetanos que viven a nivel del mar^{42,43}. Se cree que los andinos han compensado aumentando en términos de CaO₂ en reposo, mientras que los tibetanos tienen una compensación insuficiente, por lo que se considera que están en un estado de hipoxia constante. Se cree que los tibetanos deben de haberse adaptado a través de otros mecanismos³⁹ (**Tabla 1**). De hecho, se sabe que el óxido nítrico (NO; potente vasodilatador) es más alto en el aire exhalado de los tibetanos, con un mayor flujo sanguíneo a través de los vasos pulmonares y, por lo tanto, una mayor velocidad de administración de O₂ a los capilares pulmonares⁴⁴. Del mismo modo, los tibetanos tienen una red capilar más densa, lo que permite una mejor perfusión tisular en comparación con los andinos⁴⁵. También, hay evidencia de que los tibetanos tienen menos mitocondrias que los andinos, y debido a que existe una demanda oxidativa⁴⁰, algunos autores argumentan que las mitocondrias de los tibetanos han evolucionado para usar el O₂ más eficientemente⁴⁶.

Es evidente, a partir de estas diferencias entre poblaciones, que se produce una serie de adaptaciones a la hipoxia probablemente mediada en gran medida por la variación genética⁴⁷. Por lo tanto, en cualquier adaptación a la hipoxia, es probable que haya una variación significativa entre individuos.

Tibetanos	Andinos
Tasa metabólica basal normal	Tasa metabólica basal normal
RVH: ↑Ventilación en reposo	No hay RVH
↓ [Hb] ↓ CaO ₂	↑ [Hb] ↑ CaO₂
↑ NO ↑ Flujo sanguíneo pulmonar ↑ Red de capilares	No hay cambios en el flujo sanguíneo
↓ N° de mitocondrias	No hay cambios en el N° de mitocondrias

Tabla 1. Resumen comparativo de las adaptaciones fisiológicas a la hipoxia de las poblaciones a gran altura entre tibetanos y andinos. En negrita, se muestran los aspectos más relevantes.

Respuesta en el neonato

En el nacimiento natural vía vaginal se produce un episodio de hipoxia muy intenso donde la ventilación no puede ser una opción de defensa por razones mecánicas. Aunque existen diferencias entre las especies de mamíferos estudiadas (gato, conejo, rata, cordero, cerdo y humano) se sabe que el CC y por tanto el reflejo quimiorreceptor no es completo en el momento del nacimiento⁴⁸. Los animales recién nacidos combaten esta situación de estrés gracias a las células cromafines de la médula adrenal (MA), las cuales responden frente a la hipoxia. Sin embargo, como ocurre en el CC, la MA en el neonato no tiene madura su inervación sensorial, es decir, no se produce sinapsis entre las fibras simpáticas pregangliónicas colinérgicas procedentes del nervio esplácnico con las células de la MA. Por ello, la MA neonatal juega un papel fundamental en este momento del nacimiento. Las células cromafines son capaces de detectar directamente estímulos de hipoxia, hipercapnia, acidosis e hipoglucemia⁴⁹ y de responder secretando catecolaminas (CA) a la sangre. Las CA liberadas protegen al feto del estrés del nacimiento.

2.3 Sensores de oxígeno: El cuerpo carotídeo (CC)

Los quimiorreceptores periféricos arteriales en los animales superiores, es decir, los cuerpos aórticos situados en el cayado aórtico y en particular los CC, son los responsables de generar las respuestas que contrarrestan los efectos de la hipoxia. En situaciones en las que disminuye la PaO_2 los CC y los cuerpos aórticos producen respuestas reflejas, utilizando como efectores los aparatos respiratorio y circulatorio aumentando la entrada y salida de aire a los pulmones y de sangre a los tejidos, para restablecer los niveles a la normalidad. Por otro lado, el CC, junto con los quimiorreceptores centrales, tiene una función homeostática con respecto al pH. Los CC son capaces de detectar cambios en la $PaCO_2$ y la $[H^+]$ sanguínea y generar reflejos respiratorios y circulatorios para eliminar el exceso de H^+ en forma de CO_2 .

El CC fue descrito en 1743 por Albrecht von Haller y Taube, describiéndolo como “*ganglion minutum*” situado entre las arterias carótidas interna y externa, aunque lo consideraron como un microganglio vegetativo. Posteriormente, Luschka llamó al CC “*glándula intercarótica*” por su estructura de tipo glandular. Pero a partir de 1920 los estudios del profesor Fernando de Castro sobre el CC mostraron su estructura, las conexiones con el SNC y la función sensorial concluyendo que el CC detectaría los cambios de la composición química de la sangre, es decir, sería un quimiorreceptor, el primero que se descubriría en el organismo. Unos años más tarde, el investigador Corneille Heymans y cols. interesados en las hipótesis de Castro trabajaron con él y describieron la función quimiorreceptora del CC⁵⁰.

2.3.1 Organización estructural y funcional

Estructuralmente, el CC es un órgano par de tamaño pequeño situado en la bifurcación de la arteria carótida común (**Figura 5A**). El CC está irrigado por la arteria glómica que nace desde la arteria carótida externa, constituyendo una amplia red de capilares con un elevado flujo sanguíneo¹⁵. De hecho, de todos los órganos del organismo es el que tiene mayor flujo en proporción a su tamaño (1.3L/100g/min) y su consumo de O_2 es aproximadamente de 1.5mL/100g/min, lo que quiere decir que la diferencia de O_2 entre la sangre arterial y la venosa es mínima⁵¹.

Las células del CC se organizan en islotes (**Figura 5B**) separados por tejido conectivo envueltos por una amplia red de capilares, de este modo se favorece la presentación de los estímulos transmitidos por la sangre a las CQ ya que la distancia entre ambos es menor a $20\mu\text{m}$. Se denomina glomérulo o glomoide al conjunto formado por un islote celular y la red de capilares que lo envuelve.

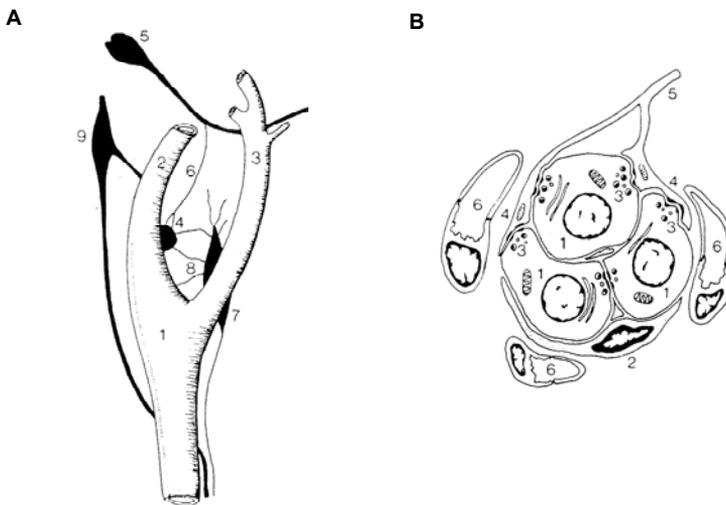


Figura 5. Ilustración de una bifurcación carotídea de conejo (A) y de un islote celular del cuerpo carotídeo (B). **A.** 1. Arteria carótida común; 2 y 3. Arteria carótida interna y externa; 4. Cuerpo carotídeo; 5 y 6. Ganglio petroso y nervio del seno carotídeo; 7 y 8. Ganglio cervical superior y nervios ganglioglomerulares; 9. Ganglio nodoso. **B.** 1. Célula quimiorreceptora; 2. Célula sustentacular; 3. Vesículas sinápticas en las células quimiorreceptoras; 4 y 5. Terminaciones y fibra sensorial; 6. Capilares sanguíneos (Tomado ref. ⁵²).

Los islotes están constituidos por dos tipos de células:

Las células **quimiorreceptoras, glómicas o de tipo I**: son funcionalmente las más importantes y también las más abundantes. Son células cromafines que tienen su origen embrionario de la cresta neural⁵³. Se encuentran en el centro de los islotes con forma redondeada u ovoidea y poseen un citoplasma con muchas mitocondrias y vesículas de núcleo denso. Contienen norepinefrina (NE), dopamina (DA), serotonina (5-HT), acetilcolina (ACh), ATP y péptidos opioides. Son células con abundante contenido de CA, principalmente DA, y la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante de la síntesis de las CA, es el marcador específico de las CQ (**Figura 6**).

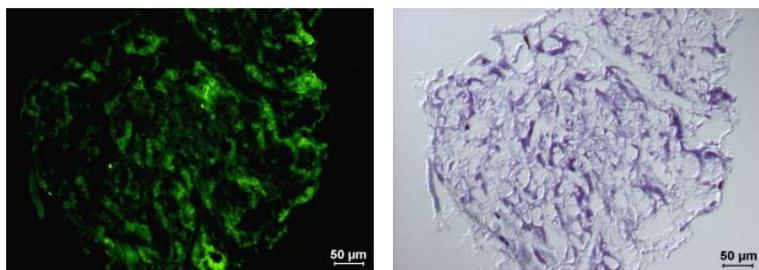


Figura 6. Cortes histológicos de CC de rata. A la izquierda un corte de tejido con reacción inmunohistoquímica para TH mostrando en verde las células TH+. A la derecha, el mismo corte contrateñido con cresil violeta muestra la estructura general del tejido (Tomado ref. ⁵⁴).

Las células **sustentaculares, de soporte o de tipo II**: son células aplanadas situadas en la periferia de los islotes. No contienen especializaciones citoplasmáticas y su núcleo tiene forma discoidea con cromatina densa. Tradicionalmente se han considerado células de soporte de naturaleza neuroglial⁵⁵. Recientemente se ha considerado que podrían contribuir, con las CQ, a la quimiotransducción sensorial del CC mediante vías de señalización paracrina y las vías catabólicas purinérgicas. De hecho, las células de tipo II expresan receptores funcionales para varios neurotransmisores excitatorios liberados por las CQ (ATP, 5-HT, ACh...) cuya estimulación conduce a la liberación adicional de ATP por aumento del Ca^{2+} intracelular; sin embargo, otros neurotransmisores del CC como la DA podrían inhibir la señalización de Ca^{2+} intracelular en las células de tipo II^{56,57}.

En cuanto a la organización funcional del CC, el nervio del seno carotídeo (NSC), una rama del nervio glossofaríngeo, está inervando las CQ a través de fibras nerviosas sensoriales, cuyos somas se localizan en el ganglio petroso. Las fibras llevan la información al tronco del encéfalo y forman la vía aferente del reflejo cardiorrespiratorio con el fin de mantener una buena oxigenación a nivel pulmonar y tisular. Por ello, el CC está considerado un órgano sensorial secundario debido a que las CQ detectan los estímulos y transducen, y es otra célula, en este caso una neurona, quien transmite la información⁵¹. A las fibras sensoriales del NSC se le unen fibras que proceden del nervio vago. Por tanto, el CC está inervado por fibras parasimpáticas y además, hay fibras simpáticas inervando las arteriolas intraglóbricas para controlar el flujo de sangre del CC de manera contraria a como lo hacen las parasimpáticas¹⁵.

La organización estructural que tiene el CC hace posible el acoplamiento funcional de sus elementos. Las CQ están cercanas a los capilares lo que hace que el espacio de difusión sea mínimo y puedan detectar rápidamente variaciones en la PaO_2 , $PaCO_2$ y pH (Detección). Cuando las células glómicas detectan los diferentes estímulos se produce la

liberación de los neurotransmisores presentes en las vesículas al espacio sináptico (Transducción) y la activación de fibras nerviosas aferentes las cuales transmiten el mensaje al SNC (Transmisión). La información sobre el estímulo presentado por la sangre se transmite rápidamente al centro respiratorio del tronco del encéfalo, y se producen cambios en los aparatos respiratorio y cardiovascular (Efectores) para corregir la alteración que ha sido detectada por el CC¹⁵ (**Figura 7**).

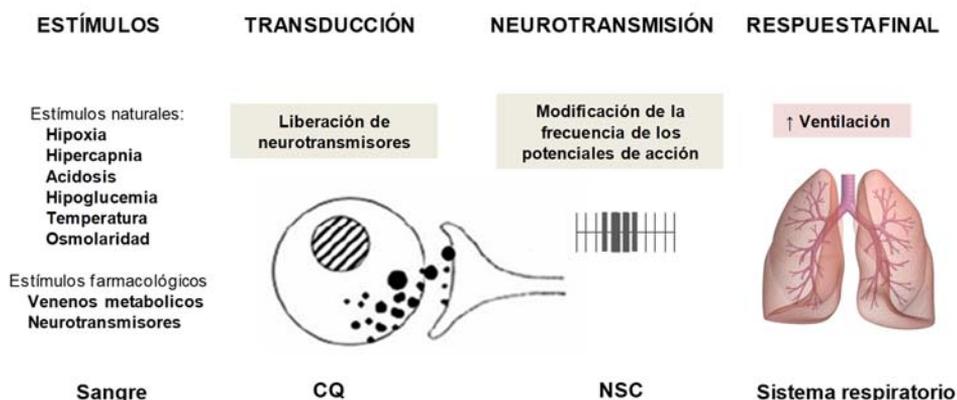


Figura 7. Etapas de la transducción sensorial del CC. Representación esquemática de la respuesta de los quimiorreceptores del CC frente a diferentes estímulos en 3 niveles: CQ, NSC y sistema respiratorio (Modificado ref. ¹⁵).

2.3.2 Fisiología del CC

Transducción sensorial

Por transducción sensorial se entiende el mecanismo que sucede en los receptores sensoriales por el que los estímulos (luminosos, químicos, térmicos, etc.) son transformados en señales eléctricas inteligibles para el sistema nervioso⁵⁸. En cuanto a la quimiotransducción sensorial en el CC existen algunas consideraciones que hay que tener en cuenta: por un lado, el CC responde a más de un estímulo fisiológico: baja PO₂ (hipoxia), alta PCO₂ (hipercapnia), bajo pH (acidosis) e incluso, es sensible a la baja concentración de glucosa. Esto quiere decir que, aunque la respuesta de las CQ presumiblemente sea la misma, la liberación de neurotransmisores¹⁵, el mecanismo por el cual el estímulo pone en marcha la transducción puede ser completamente diferente. Por otro lado, las propiedades eléctricas de las CQ de distintas especies de animales estudiadas son diferentes³⁵, por lo tanto, es muy probable que existan diferencias en el proceso de transducción entre las especies. La combinación de ambos puede hacer inadecuada la extrapolación o generalización de resultados obtenidos en una especie

animal con los de otras especies⁵⁸. A continuación, se discuten los mecanismos de detección de la hipoxia y más brevemente los mecanismos de detección de la hipercapnia y la acidosis por las CQ.

Se conocen varias teorías sobre el proceso de transducción a la hipoxia: la teoría ácida propuesta por Winder en 1937, la teoría metabólica propuesta por Anichkov y Belen'kii en 1963 y la teoría del "modelo de membrana" propuesta por González y cols. en 1992 (**Figura 8**).

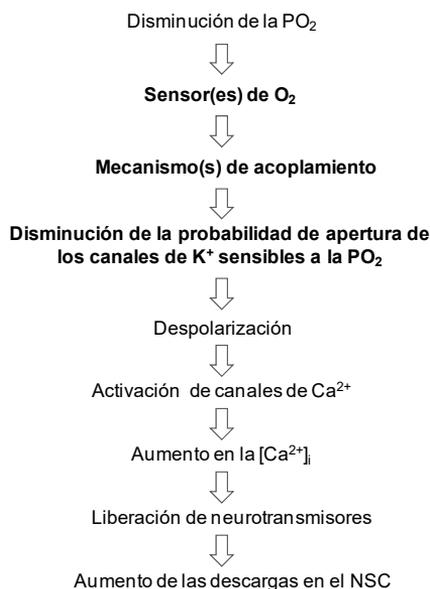


Figura 8. Modelo de membrana de transducción del estímulo hipóxico en el CC. Los aspectos menos caracterizados aparecen en negrita (Tomado ref. ⁵⁸).

En esta última se propone que las CQ detectarían la disminución de la PO_2 en sangre, este estímulo produciría la inhibición de los canales de K^+ y como resultado de ello la despolarización de las células. Esta despolarización de la membrana celular promovería la activación de canales de Na^+ y de Ca^{2+} voltaje dependientes, esto llevaría a un aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, dando lugar a la liberación de neurotransmisores y el aumento de la frecuencia de descargas de potenciales de acción (PA) del NSC^{15,52}. El aumento de la frecuencia de PA se integra a nivel del tronco del encéfalo en el núcleo del tracto solitario y desde aquí parten las órdenes a los sistemas respiratorios y cardiovasculares que modifican su función, aumentando la ventilación, estimulando el sistema nervioso simpático (SNS), modulando el flujo sanguíneo y el rendimiento cardíaco¹⁵, con el fin de revertir la alteración detectada por el CC.

Aunque el modelo de membrana está vigente, hay varios aspectos del mismo que aún están sin resolver como son: i. cómo las células detectan la PO_2 ; ii. cómo los canales de K^+ se acoplarían a los posibles mecanismos de detección; iii. cuál es la identidad molecular de los canales de K^+ sensibles a la PO_2 (Kv en conejo³⁵ y maxi-K y TASK-1 en rata⁵⁸⁻⁶⁰). Durante los últimos años las líneas de investigación sobre mecanismos de quimiotransducción hipóxica aguda se han centrado en la integración de la señalización mitocondrial y de membrana dando lugar a al menos cinco teorías bien documentadas sobre la detección de O_2 ⁶¹ (**Figura 9**).

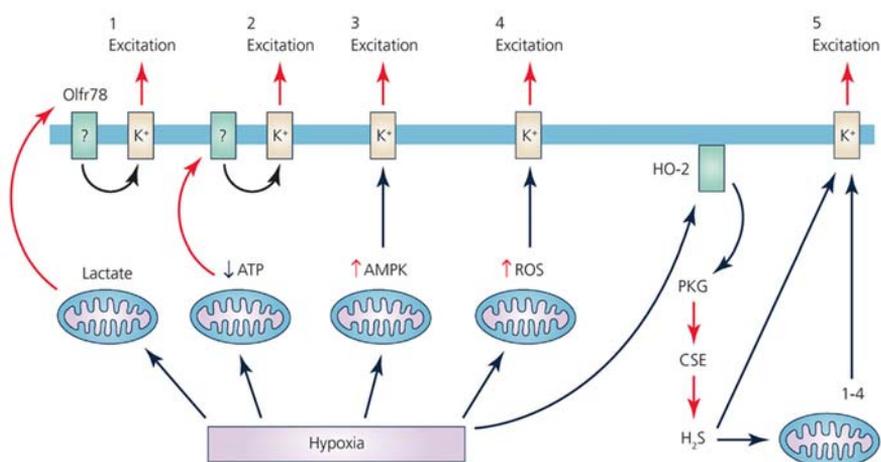


Figura 9. Hipótesis actuales de detección de O_2 por las CQ de CC: hipótesis del lactato-Olf78; papel del ATP mitocondrial y el metabolismo; hipótesis de la activación de la proteína quinasa AMP; ROS como transductores en la cascada de detección de O_2 ; y mecanismos por los cuales H_2S , ROS y HO pueden integrarse para proporcionar un sistema de transducción de detección de O_2 (Tomado ref. ⁶¹).

Hipótesis del lactato-Olf78. Según esta teoría la hipoxia inhibiría el transporte de electrones en las mitocondrias de las CQ, produciendo aumento de lactato. El lactato desde el exterior activaría el receptor Olf78 acoplado a proteínas G, que por un mecanismo aún no determinado haría que las CQ se despolaricen y liberen neurotransmisores⁶². Sin embargo, existen algunos aspectos sin aclarar en esta hipótesis. Por ejemplo, si el mecanismo acoplado a una proteína G puede ser lo suficientemente rápido como para producir la respuesta hipóxica celular, la sensibilidad del receptor Olf78 al lactato⁶³ o la expresión del receptor principalmente en tejidos no sensibles a O_2 ⁶⁴. Los estudios muestran que para que Olf78 esté involucrado en la detección de O_2 necesita asociarse con mitocondrias que sean inusualmente sensibles a la hipoxia y localizadas en un ambiente donde la activación de los canales iónicos se realice rápidamente⁶¹.

Hipótesis del ATP mitocondrial o metabólica. Se ha demostrado que los canales de K^+ controlan el potencial de membrana en reposo de las CQ y se puede inhibir mediante la inhibición mitocondrial lo que conduce a la excitación y, por lo tanto, a la liberación de neurotransmisores⁶⁵. Varas y cols. demostraron que los canales de K^+ tipo TASK son fuertemente activados por MgATP⁶⁶. Según esta hipótesis, la hipoxia inhibiría la producción de ATP, los canales TASK se cerrarían despolarizando a la célula y liberando neurotransmisores. Sin embargo, no se conoce el posible sensor del nucleótido-Mg que pudiera regular el canal TASK⁶¹.

Hipótesis de la activación de la proteína quinasa AMP. La hipoxia inhibiría el transporte de electrones mitocondrial causando un efecto final en la producción de ATP. Este descenso en la producción de ATP se mitigaría con la adenilato quinasa, que convierte ADP en ATP y AMP y, en consecuencia, los niveles de AMP aumentarían en la célula. Este aumento en los niveles de AMP activaría AMPK, que fosforilaría los canales iónicos de membrana y provocaría la despolarización y la liberación de neurotransmisores⁶⁷. Para probar la hipótesis se utilizaron ratones *knockout* de las subunidades catalíticas de AMPK en tejido TH+, incluido el CC. Aunque se observa que AMPK juega un papel clave en la generación de la RVH, no parece intervenir en la detección al O_2 del CC^{68,69}. Esto podría deberse a una compensación en el *knockout* en un sistema como el CC donde parece haber una gran cantidad de mecanismos alternativos de detección de O_2 que compensarían la falta de AMPK⁶¹.

Hipótesis de señalización del complejo I mitocondrial. Recientemente se ha descrito que la inhibición hipóxica del transporte de electrones mitocondrial produce un aumento de ROS y nucleótidos de piridina reducidos del complejo I de las mitocondrias^{70,71}. Este aumento en la producción de ROS cambiaría el estado redox de los canales iónicos de membrana y, por lo tanto, iniciaría la excitación. Además, esta hipótesis pone énfasis en la existencia de microdominios entre las mitocondrias y los canales iónicos de membrana que facilitarían la modulación de la actividad del canal iónico del CC. Sin embargo, resultados utilizando agentes oxidantes/reductores contradicen el papel de los ROS en la detección del O_2 aunque podría argumentarse que su acción pudiera ser inespecífica en la señalización que ocurre en microambientes subcelulares^{72,73}.

Hipótesis del H₂S. Las CQ del CC expresan los enzimas HO-2 (hemooxigenasa 2) y CSE (cystathionine-γ-lyase) que sintetizan CO y H₂S, respectivamente. Actualmente se cree que existe una relación compleja entre estos dos transmisores gaseosos. El modelo propuesto por Prabhakar y cols. es el siguiente. En normoxia, la enzima CSE productora de H₂S sería inhibida por CO y como resultado no se produciría incremento de la actividad del CC. Por otro lado, la disminución de PaO₂ inhibiría la HO-2 produciendo menos CO, la disminución en la producción de CO conduciría a una disminución en la fosforilación de un enzima dependiente de proteinkinasa G, y como consecuencia el enzima CSE se activaría y aumentaría la producción de H₂S dando lugar a la inhibición de los canales de K⁺, la excitación celular y la liberación de neurotransmisores⁷⁴ (**Figura 10**). Sin embargo, como en las hipótesis anteriores, existen contradicciones. Estudios recientes han indicado que un aumento de H₂S no modifica los canales iónicos⁷⁵ y que los enzimas que producen H₂S no tienen efecto sobre la detección aguda de O₂ en el CC⁷⁶.

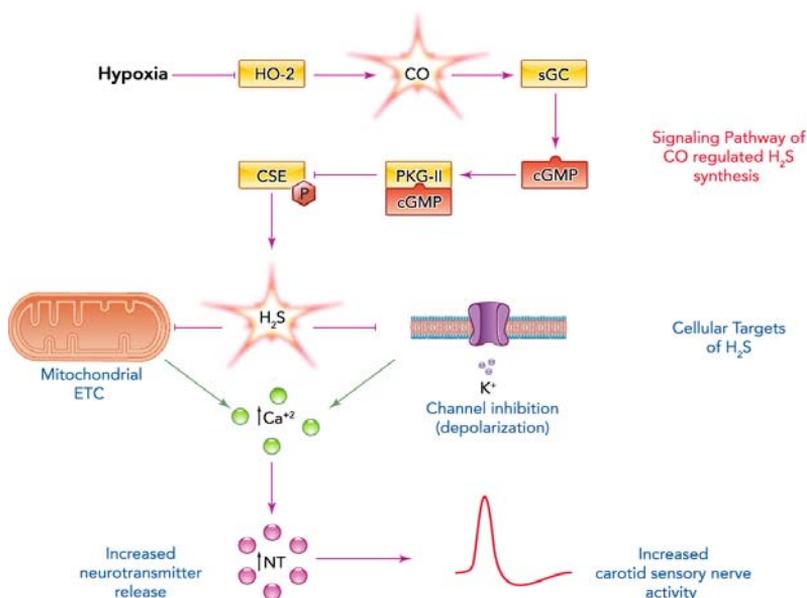


Figura 10. Esquema de la generación de H₂S regulada por CO en las CQ de CC. sGC, guanilato ciclasa soluble; cGMP, guanosín monofosfato cíclico; PKG- II, proteinkinasa G-II; ETC, cadena transportadora de electrones; NT, neurotransmisor (Tomado ref. ⁷⁷).

La acidosis y la hipercapnia son otros estímulos naturales a los cuales el CC es sensible. Sin embargo, la señal que las CQ del CC detectan es el cambio en la concentración de protones intracelular ($[H^+]_i$) y no el aumento de la PCO_2 . La anhidrasa carbónica, enzima intracelular de las CQ⁷⁸, acelera la hidratación y deshidratación del CO_2 , produciendo cambios en la $[H^+]$ en respuesta a alteraciones de la PCO_2 . Así, la inhibición de este enzima elimina los cambios transitorios en el incremento de la frecuencia de descargas producido por la estimulación hipercápnica tanto *in vitro* como *in vivo*⁵⁸. Existen dos modelos para explicar la transducción del estímulo ácido (**Figura 11**). En el modelo propuesto por nuestro grupo en 1991, el aumento de la liberación de neurotransmisores depende de la entrada de Ca^{2+} a través del intercambiador Na^+/Ca^{2+} , ya que, los bloqueantes-antagonistas de canales voltaje dependientes de Ca^{2+} no inhiben la secreción inducida por el ácido de las CQ, sin embargo sí que lo hacen los inhibidores del intercambiador Na^+/H^+ ⁷⁹. El otro modelo es parecido al descrito en la detección a hipoxia, pero basado en la propia sensibilidad de los canales de K^+ en el que la entrada de Ca^{2+} tendría lugar por canales de Ca^{2+} voltaje dependiente. El estímulo ácido sería capaz de despolarizar las células y generar PA^{80,81}. Por otro lado, se ha encontrado que canales de K^+ sensibles a hipoxia también son sensibles a la acidosis. Así, el Maxi- K^+ muestra sensibilidad al pH_i ⁵⁹ y el TASK-1 al pH_e ⁶⁰.



Figura 11. Modelos de transducción del estímulo ácido/hipercápnico. A la derecha el modelo propuesto por nuestro grupo⁷⁹ y a la izquierda el modelo propuesto por Buckler y Vaughan-Jones^{80,81}. HA: ácido débil (Tomado ref. ⁵⁸).

Aparentemente la transducción del estímulo ácido resulta igual de compleja que la del estímulo hipóxico. Las CQ son capaces de responder a ambos estímulos de modo independiente, aunque parece que su efecto sobre los niveles de Ca^{2+} en las CQ es multiplicativo, lo que implica una sinergia entre ambos estímulos⁸².

Neurotransmisión

El CC como órgano sensorial secundario lleva implícito el proceso de neurotransmisión que se produce entre las CQ y las terminaciones sensoriales. Como en la transducción, los neurotransmisores y mecanismos responsables de la comunicación tampoco son bien conocidos. Hay un progreso significativo en la comprensión de cómo los neurotransmisores liberados por las CQ como ATP, adenosina, DA, 5-HT y ACh generan la descarga aferente en condiciones normales y fisiopatológicas. Sin embargo, las CQ además de su inervación sensorial interactúan con las células vecinas de tipo II. Esta disposición morfológica de "sinapsis tripartita" sugiere que la estimulación paracrina de las células tipo II, mediante una variedad de neurotransmisores procedentes de las CQ, puede desencadenar el aumento de Ca^{2+} intracelular y como consecuencia la liberación de "gliotransmisores" como el ATP a través de la activación de los canales panexina-1⁸³.

Los principales transmisores responsables de la respuesta excitatoria postsináptica son probablemente el ATP y la adenosina; sin embargo, las contribuciones de otros transmisores (ACh, 5-HT, histamina) no pueden ignorarse y pueden depender de la edad, la especie o la presencia de condiciones fisiopatológicas^{16,84-87}. Además, la magnitud de la respuesta excitatoria en el NSC parece atenuarse por la acción simultánea de neurotransmisores inhibitorios como la DA^{83,88-90}.

El papel del ATP como transmisor primario tiene un fuerte apoyo en varios estudios, en los que demuestran que el ATP actuaría a través de receptores postsinápticos P2X2/3 durante la quimioexcitación mediante las siguientes observaciones: i. las neuronas petrosas quimiosensibles en los cocultivos expresan receptores funcionales P2X2/3⁹¹; ii. las subunidades inmunorreactivas P2X2 y P2X3 se localizan en las terminaciones neuronales petrosas opuestas a las CQ en secciones de tejido de CC^{91,92}; iii. los ratones *knockout* P2X2 muestran una RVH marcadamente atenuada⁹³; iv. la hipoxia aguda induce la liberación de ATP vesicular dependiente de Ca^{2+} a partir de CC aislados, cortes y células cultivadas de CC^{84,94}; v. en preparaciones *in vitro* del NSC los antagonistas selectivos del receptor P2X2/3 y P2X3 inhiben la descarga del NSC provocada por la hipoxia⁹⁵⁻⁹⁷; y vi. en el modelo de cocultivo, el bloqueo selectivo del receptor P2X, inhibe la respuesta postsináptica inducida por la hipoxia en la neurona petrosa, pero no el potencial del receptor presináptico en las CQ. Aunque la mayoría de los datos anteriores se obtuvieron en preparaciones de roedores, también se observó un papel postsináptico excitador del ATP en el CC de gato^{83,86,96,98}. Los experimentos realizados en rata responsabilizan al ATP del 50% de la actividad en el NSC

desencadenado por la hipoxia⁹⁵. En este sentido, se ha encontrado que durante la hipoxia aguda y la hipercapnia, una fracción significativa de la descarga sensorial del NSC depende de la estimulación de los receptores postsinápticos de adenosina de alta afinidad, A2aR⁹⁹⁻¹⁰¹. La adenosina extracelular en la sinapsis quimiosensorial del CC se genera a través de transportadores de nucleósidos en CQ y/o la hidrólisis del ATP extracelular^{84,102,103}. En un estudio de Conde y cols. en 2012 se demuestra que dependiendo de la intensidad del estímulo el neurotransmisor principal es uno u otro: en hipoxias moderadas es la adenosina mientras que en hipoxias intensas el acoplamiento entre CQ-terminaciones nerviosas se realiza mediante el ATP⁸⁴.

El papel de la ACh como neurotransmisor excitatorio en el CC aún es controvertido^{12,86,104}. El CC de varias especies estudiadas expresa receptores de ACh nicotínicos y muscarínicos pero existen dudas sobre si las CQ sintetizan y almacenan ACh en todos los casos^{86,105-107}. Sin embargo, se ha detectado la liberación de ACh inducida por la hipoxia a partir de CC intactos en varias especies, incluidos gatos, conejos y humanos^{12,98,107,108}. Además, en el modelo de cocultivo de CC de rata es necesaria una combinación de bloqueadores nicotínicos y purinérgicos para inhibir la mayor parte de la respuesta postsináptica inducida por hipoxia^{83,91}.

La DA es probablemente el neurotransmisor inhibitorio mejor descrito del CC¹⁰⁹ y el más abundante. En un estudio reciente en cocultivos de CC de rata, la DA provocó una disminución en la excitabilidad de la membrana en neuronas quimiosensoriales petrosas y su efecto se evitó con el antagonista selectivo del receptor D2, sulpiride¹⁰⁰. El contenido de DA en el CC es alto pero la proporción DA/NE varía entre las distintas especies: hay animales (rata, ratón y conejo) cuyos CC son dopaminérgicos y otros mixtos, noradrenérgicos y dopaminérgicos (gato)⁵⁸. Por otro lado, la liberación de CA en CQ aisladas o en el CC intacto frecuentemente se utiliza como un índice de la activación de las CQ. Todos los estímulos detectados por el CC producen la secreción de CA y, además, hay una correlación entre la intensidad del estímulo y el aumento de secreción de DA y de frecuencia de PA en el NSC. Sin embargo, Donnelly muestra en sus estudios que en animales reserpinizados o frente a estimulación repetida este paralelismo decae: la secreción de DA disminuye con cada estímulo pero se mantiene constante la frecuencia de descargas en el NSC^{110,111}.

2.3.3 Fisiopatología del CC

Tradicionalmente el CC se ha relacionado con patologías humanas como la muerte súbita del lactante, el síndrome de hipoventilación central congénita, además de la mayor afección médica común asociada al CC que son los tumores^{112,113}. Sin embargo, en la última década, la atención se centra en la idea de que el CC pudiera estar implicado en varias enfermedades relacionadas con la sobreactivación simpática. Se ha observado que un aumento anormal en la descarga quimiosensorial del CC contribuye a potenciar el simpático en varias enfermedades humanas como la hipertensión neurogénica, la AOS, la insuficiencia cardíaca sistólica y la diabetes. Los resultados experimentales muestran hiperactividad simpática, reducción de la sensibilidad cardíaca barorreflexa y alteración de la variabilidad de la frecuencia cardíaca y de la estabilidad respiratoria. Resultados preliminares de denervación o ablación del CC apoyan la idea de que la eliminación de la unidad quimiosensorial del CC sería útil para restaurar la disfunción autonómica y cardiorrespiratoria en dichas enfermedades¹¹⁴ (**Tabla 2**).

Modelo animal	Efectos observados
Hipertensión en ratas hipertensas espontáneas (SHR)	BCSD en ratas jóvenes SHR impidió la hipertensión. BCSD en adultos SHR redujo la PAS ~ 20mmHg. ¹¹⁵
Fallo cardíaco crónico inducido por ligadura coronaria en ratas	BCBA redujo la activación neuronal en el bulbo rostral ventrolateral (RVLM), la remodelación cardíaca, el deterioro de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y las arritmias cardíacas. ¹¹⁶
Fallo cardíaco inducido por estimulación en conejos	BCSD impidió el aumento de la actividad simpática y de la respuesta ventilatoria. ¹¹⁷
Síndrome metabólico en ratas	BCSD normalizó la actividad simpática y los niveles plasmáticos de glucosa e insulina e invirtió el aumento de peso inducido por la dieta hipercalórica. ^{118,119}
El modelo de rata AOS	BCBA normalizó la PAS después de 21 días de HCl. Restauró la respuesta cardíaca autonómica y el reflejo barorreceptor, mejoró la RVH y redujo el número de arritmias. ¹²⁰

Tabla 2. Efectos de la denervación bilateral del seno carotídeo (BCSD) o ablación bilateral del cuerpo carotídeo (BCBA) en las alteraciones autonómicas y cardiorrespiratorias observadas en modelos preclínicos de enfermedades relacionadas con el simpático (Modificado ref. ¹¹⁴).

2.3.4 El caso especial del cobaya: Hipofuncionalidad del CC

Se sabe que el cobaya, originario de los Andes, tiene una respuesta ventilatoria reducida o nula a la hipoxia en comparación con otros mamíferos. Esto implicaría que los CC no son completamente funcionales, relacionándolo con un reflejo del CC pobre ante estímulos hipóxicos. La mayoría de los autores observan que los cobayas aunque no hiperventilan a la hipoxia sí lo hacen a la hipercapnia y además, es una respuesta comparable a la que se observa en rata¹²¹⁻¹²⁴. Esto demuestra que los quimiorreceptores centrales median la mayor parte de la respuesta ventilatoria a la hipercapnia^{125,126}, así como que se mantienen los mecanismos de integración a nivel de los centros respiratorios troncoencefálicos.

Con relación a la falta de respuesta ventilatoria a la hipoxia, Schwenke y Cragg realizaron un estudio en el cobaya cuya denervación del CC no eliminó el ligero aumento de la RVH observada en animales controles, lo que indica que este ligero aumento de la ventilación se originaría fuera del CC, posiblemente en los cuerpos aórticos¹²¹. Sin embargo, en un estudio del grupo de Zapata obtuvieron resultados distintos basándose en el test de Dejours¹²⁷. Con este test comprobaron que al respirar una mezcla rica en O₂ (↑PO₂) las descargas disminuyen bruscamente y que existe una disminución en la ventilación de hasta el 20-40% al pasar de una mezcla hipóxica a una mezcla rica en O₂. Este efecto observado tanto en humanos como en animales, se conoce como test Dejours, nombre de quien lo describió y que define en cada caso la contribución del CC en el mantenimiento de la ventilación/min. Estos autores por tanto encontraron en el cobaya que su reflejo quimiorreceptor estaba contribuyendo al mantenimiento de la ventilación al igual que en la rata¹²⁷.

Las características particulares del cobaya se han considerado una adaptación genética a la gran altitud que se manifiesta en: la alta afinidad de la hemoglobina por el O₂ (P₅₀<30) y el desarrollo de la eritrocitosis cuando se expone a hipoxia crónica¹²⁸.

Recientemente nuestro laboratorio ha realizado un estudio sobre la funcionalidad del CC del cobaya frente a la hipoxia aguda y crónica¹²⁹. De forma resumida, los resultados muestran que:

Los cobayas solo son capaces de hiperventilar en respuesta a hipoxias intensas (7%O₂) e hipercapnia (5%CO₂). Esto podría deberse a que la detección/transducción hipóxica del CC u otros elementos del reflejo quimiorreceptor no son completamente funcionales en el cobaya y/o que el umbral de activación es mayor. Sin embargo, la respuesta hipercápnica es similar a la de las ratas. Esta respuesta generada

parcialmente por el CC y principalmente por los quimiorreceptores centrales^{15,126}, sugiere que el CC y las proyecciones centrales del cobaya son funcionales o, alternativamente, que los quimiorreceptores centrales del cobaya compensan la contribución del CC a la respuesta hipercápnicica en otros roedores.

Los CC de cobaya muestran un tamaño similar al de la rata, aunque relacionándolo con el peso del animal son hipotróficos. Además, tras la exposición de los animales a hipoxia crónica sostenida (HCS: 11% O₂; durante 15 días) el peso del CC del cobaya no se modifica, mientras que el de rata en las mismas condiciones se duplica. La hipertrofia del CC de rata por ambientes hipoxémicos es debida principalmente a un aumento de los vasos en el CC^{130,131}, aparentemente causado por una producción aumentada de VEGF en CQ^{132,133}. Podría ser que la HCS no aumente el VEGF en el CC del cobaya. Sin embargo, el hematocrito de cobaya aumenta significativamente después de la exposición a HCS¹³⁴, indicando que HIF-1 α , el factor de transcripción que induce la expresión de EPO y del VEGF, se activa durante la hipoxia¹³⁵.

Los cobayas son hipotensos y tienen una PaO₂ menor que las ratas, probablemente relacionada con un bajo tono simpático y una alta afinidad de la Hb por el O₂. La baja presión arterial también se ha relacionado con una mayor capilaridad en los tejidos periféricos y se ha observado que los cobayas tienen una mayor densidad de capilaridad en la circulación pulmonar que las ratas¹³⁶. Estas características podrían representar una mayor tolerancia al entorno hipóxico que otros roedores.

Aunque los CC son hipo-funcionales y no muestran sensibilización a la hipoxia crónica, un pequeño porcentaje de las CQ aisladas del CC contienen enzima TH. Además, se muestra por primera vez que las CQ de cobaya tienen corrientes de K⁺ dependientes de voltaje, aunque no sensibles a O₂, por lo tanto, son excitables. La hipoxia no modifica los niveles de Ca²⁺ citosólico (Ca^{2+_c}) ni la secreción de CA; sin embargo, el alto K⁺_e aumenta los niveles de Ca²⁺ notablemente. Esto indicaría que las CQ de cobaya expresan canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje activados cuando las células se despolarizan^{129,137}.

En conjunto, estos datos implican que parte de los mecanismos responsables de la respuesta a la hipoxia aguda propuestos en el CC de otras especies no son completamente funcionales en el cobaya.

2.4 La apnea obstructiva del sueño (AOS) y el síndrome de apnea hipopnea del sueño (SAHS)

La hipoxia siempre ha sido un tema importante tanto desde el punto de vista fisiológico como clínico. La investigación tradicional sobre hipoxia se ha centrado en el efecto de la HCS y la respuesta adaptativa humana a gran altitud. Sin embargo, en los últimos años ha habido un crecimiento sorprendente en la investigación de la HCI debido a su importancia en la AOS. La primera vez que se hizo referencia literaria sobre un trastorno respiratorio del sueño fue en el siglo XIX cuando se comenzó a hablar del síndrome de Pickwick describiendo a individuos roncadores, obesos y con elevada somnolencia, a través del personaje descrito en la novela “Los papeles póstumos del Club Pickwick” de Charles Dickens, en 1837. En 1976, Guilleminault definió el síndrome de apnea del sueño¹³⁸, describiendo a individuos con hipersomnolencia diurna y obesidad los cuales por la noche padecían episodios de apnea o cese de la respiración. Algo más tarde, se definió el término hipopnea como el episodio en el que la señal respiratoria se reduce parcialmente y va acompañado de desaturación de O₂ durante el sueño, ampliándose el término a síndrome de apnea hipopnea durante el sueño (SAHS)^{139,140}. En 1981, Sullivan propuso la aplicación de presión positiva continua en la vía aérea (CPAP) como tratamiento para esta enfermedad¹⁴¹. Por último, la publicación de Young y cols. en 1993 sobre la prevalencia de este síndrome llevó a considerarlo un problema prioritario de salud pública¹⁴².

Existen tres elementos implicados en el control de la respiración: el centro de control respiratorio, los quimiorreceptores centrales y periféricos, y los músculos respiratorios¹⁴³ (**Figura 12**).

Centro de control respiratorio: consta de dos sistemas interrelacionados el automático y el voluntario. El automático se localiza en el tronco del encéfalo, en concreto en los centros bulbares y pontinos. En los centros bulbares están el grupo respiratorio dorsal (GRD) y el grupo respiratorio ventral (GRV). El GRD son neuronas inspiratorias cuyos axones son proyectados hacia la médula espinal contralateral estimulando las motoneuronas del nervio frénico hacia el diafragma para la inspiración. Por el contrario, el GRV tiene neuronas espiratorias las cuales inhiben a las motoneuronas del nervio frénico en la espiración. El voluntario se localiza en la corteza cerebral y en otras zonas subcorticales, como el hipotálamo, y va a ejercer su función sobre el sistema automático en el tronco del encéfalo o directamente sobre las motoneuronas de los músculos respiratorios.

Quimiorreceptores: intervienen en el control automático de la respiración. Los quimiorreceptores centrales, que se encuentran en la región ventrolateral del bulbo raquídeo, son capaces de detectar modificaciones en el pH del líquido extracelular y del líquido cefalorraquídeo. Por tanto, son sensibles a los cambios en PaCO₂ ya que este cambio modifica la PCO₂ del líquido cefalorraquídeo variando el pH. Los quimiorreceptores periféricos son sensibles a cambios en la PaO₂, PaCO₂ y pH sanguíneo, transmitiendo esta información al centro de control respiratorio central para que desde allí se produzcan los cambios apropiados en la ventilación. Las terminaciones nerviosas aferentes transmiten la información desde el CC y desde los cuerpos aórticos al tronco del encéfalo a través del glosofaríngeo y del nervio vago, respectivamente.

Reflejos pulmonares: poseen varios tipos de receptores que participan en el control de la respiración a través de las fibras sensitivas de los nervios vagos. Un ejemplo son los receptores de distensión pulmonar localizados entre las células de músculo liso de la vía respiratoria que se activan cuando el volumen corriente aumenta por encima de los valores normales evitando una distensión excesiva de los pulmones.

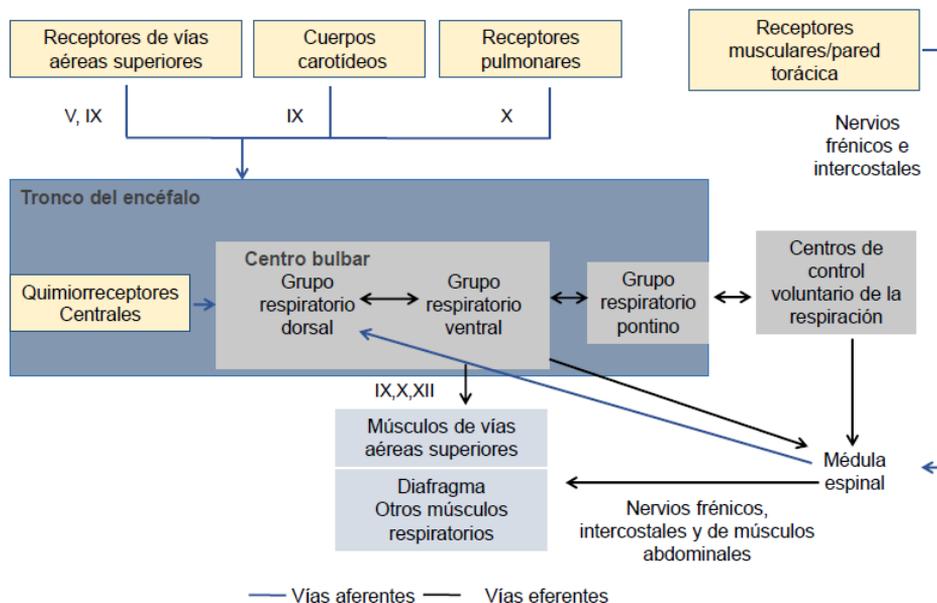


Figura 12. Esquema del control respiratorio. V: nervio trigémino; IX: nervio glosofaríngeo; X: nervio vago; XII: nervio hipogloso (Tomado ref. ¹⁴³).

Al iniciarse el sueño se produce lo siguiente: disminuye el metabolismo basal, se pierde el estímulo voluntario de la respiración y decrece el estímulo ventilatorio de las aéreas suprapontinas a las neuronas respiratorias bulbares. También disminuye la respuesta a estímulos químicos y mecánicos del centro respiratorio, al igual que la RVH y RVHC aunque se mantienen lo suficiente con el objetivo de prevenir cambios en el intercambio gaseoso¹⁴⁴.

En la fase REM del sueño, desciende la actividad nerviosa que llega a los músculos inspiradores y dilatadores de las vías aéreas, lo que lleva a disminuir la ventilación y a aumentar la resistencia de la VAS, favoreciendo la aparición de obstrucciones^{145,146}. En esta fase es la actividad del diafragma quién mantiene la respiración. Todo lo anterior sucede de modo fisiológico, pero una disminución anormal de las señales respiratorias hacia los músculos dilatadores, o una respuesta más baja de lo normal de éstos a las órdenes motoras troncoencefálicas, produce una obstrucción de la VAS durante la inspiración¹⁴⁷. Además, la actividad en el electromiograma (EMG) del geniogloso en pacientes con AOS está disminuida y esto produce que la lengua caiga hacia atrás obstruyendo la VAS¹⁴⁸.

Durante el día la vía aérea se mantiene abierta, pero cuando el paciente con AOS se duerme los músculos se relajan produciendo el colapso y la obstrucción de la vía aérea. Un episodio apnéico comienza con un descenso en la saturación de O₂ arterial y ralentización del ritmo cardíaco, pero al final del episodio se acelera el ritmo cardíaco, aparecen ondas alfa propias del estado de vigilia y un EMG con alta actividad para recuperar el tono muscular que abra la vía aérea. Los microdespertares alteran la organización normal del sueño haciendo que sea de baja calidad y responsable de la fatiga y la somnolencia que presentan los individuos que padecen AOS¹⁴⁹.

2.4.1 Definición de AOS y SAHS

La AOS es una afección respiratoria crónica caracterizada por ronquidos fuertes y colapso intermitente de la VAS a nivel faríngeo que resulta en un cese total (apnea) o parcial (hipopnea) del flujo de aire¹⁵⁰. La apnea e hipopnea tienen una duración de 20 a 40 segundos y pueden ocurrir hasta 60 veces por hora de sueño. Esta anomalía en la respiración produce desaturación de O₂ arterial (hipoxemia) y cuando se repite con frecuencia conduce a un aumento gradual de los niveles de CO₂ (hipercapnia)¹⁵¹.

La gravedad de la AOS se define por el índice de apnea hipopnea (IAH) que es la frecuencia de eventos apnéicos e hipopneas ≥ 10 s por hora de sueño. El IAH de 5-15 eventos/h, 15-30 eventos/h y >30 eventos/h son indicativos de AOS leve, moderada y

grave, respectivamente¹⁵². Alternativamente, se considera que un IAH de 0 a 4 eventos/h es normal. Debido a que con cada obstrucción la PO₂ y la saturación de la oxihemoglobina (St. HbO₂) disminuyen, hay otros criterios clasificatorios de la gravedad de la AOS basados en el grado de desaturación de la oxihemoglobina como el valor mínimo de St. HbO₂ y el % de tiempo total con una saturación de O₂ total por debajo del 90% (T<90%).

Hay tres tipos de apneas del sueño:

Obstructiva: presenta ausencia o reducción >90% de la señal respiratoria >10s de duración en presencia de esfuerzo respiratorio.

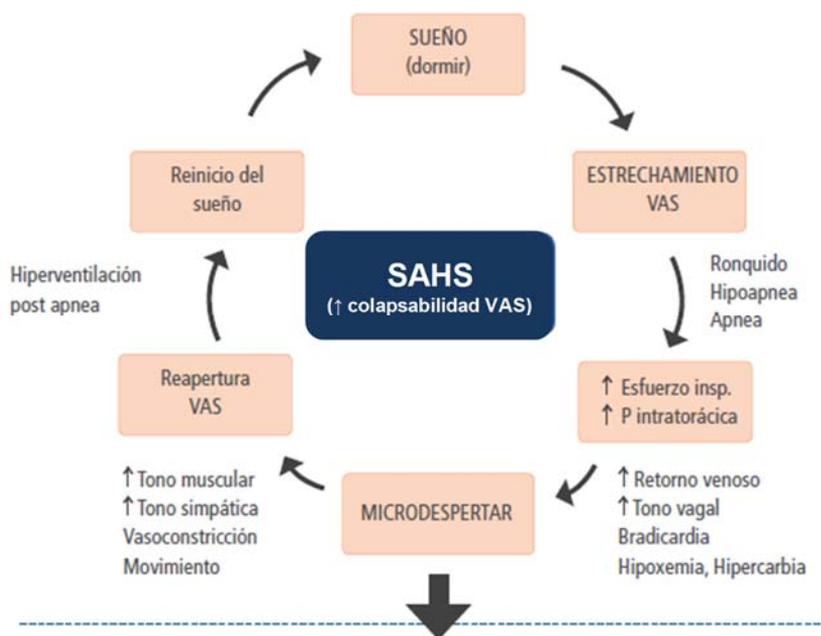
Central: caracterizada por la ausencia o reducción >90% de la señal respiratoria >10s de duración en ausencia de esfuerzo respiratorio.

Mixta: es un evento respiratorio que, habitualmente, comienza con un componente central y termina en un componente obstructivo.

Una hipopnea se define como una reducción en el flujo de aire $\geq 30-50\%$ $\geq 10s$ asociado a una disminución en la St. HbO₂ >3-4%.

Las apneas e hipopneas durante el sueño conducen a desaturaciones repetidas de la oxihemoglobina, lo que determina HI, fragmentación del sueño debido a los microdespertares y cambios de presión intratorácica causados por el esfuerzo inspiratorio. Finalmente, todo lo anterior da lugar a largo plazo a los efectos mórbidos del SAHS a nivel neurocognitivo^{153,154}, cardiovascular^{155,156} y metabólico¹⁵⁷ (**Figura 13**).

A partir del documento Nacional de Consenso sobre el SAHS de 2005 se incluye la referencia de hipopnea en la nomenclatura, y se engloba todos los tipos de apneas tanto obstructivas, como centrales y mixtas. En este documento se define al SAHS como “un cuadro de somnolencia excesiva, trastornos cognitivo-conductuales, respiratorios, cardíacos, metabólicos o inflamatorios secundarios a episodios repetidos de obstrucción de la vía aérea superior durante el sueño”¹⁵⁸. La fisiopatología del SAHS es compleja y no se conoce bien todavía, el origen parece ser multifactorial donde interaccionan factores anatómicos y funcionales.



Patología cardiovascular	<ul style="list-style-type: none"> - Hipertensión sistémica - Insuficiencia cardíaca congestiva (disfunción sistólica y diastólica) - Enfermedad de la arteria coronaria - Arritmias - Hipertensión pulmonar
Patología neuropsiquiatría	<ul style="list-style-type: none"> - Depresión - Insomnio y/o excesiva somnolencia diurna - Anormalidades cognitivas y neuroconductuales: deterioro de concentración, percepción, memoria y rendimiento - Trastorno hiperactivo de déficit de atención
Patología metabólica	<ul style="list-style-type: none"> - Diabetes mellitus tipo 2 - Intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina - Síndrome metabólico
Otras	<ul style="list-style-type: none"> - Genitourinario: nocturia y disfunción sexual - Reflujo gastroesofágico

Figura 13. Resumen de los factores fisiopatológicos más relevantes y patologías asociadas del SAHS (Modificado ref. ¹⁵⁹).

2.4.2 Epidemiología y factores de riesgo del SAHS

El SAHS es un trastorno altamente frecuente que afecta al 2-4% de las mujeres y al 4-6% de los hombres de la población adulta de edad media^{151,160}. Hay evidencias de que el riesgo de desarrollar SAHS está relacionado con la obesidad y el sexo masculino¹⁵¹ y de que la prevalencia aumenta con la edad¹⁶⁰. De hecho, los estudios epidemiológicos muestran tasas de prevalencia más altas en hombres que en mujeres con una proporción de 2-3:1¹⁶¹. En las mujeres es en la edad post menopáusica cuando principalmente se presenta el SAHS. En niños tiene una prevalencia alrededor del 2% entre los 4 y los 5 años¹⁶², y sus consecuencias son parecidas a las descritas en adultos¹⁵³. Después del asma bronquial y la EPOC es la enfermedad respiratoria más frecuente y es la principal causa de HC debido a la HI en el humano.

Los estudios muestran que el SAHS está asociado a trastornos cognitivos y a pérdida de calidad de vida. Las personas con SAHS tienen accidentes de tráfico con una frecuencia tres veces mayor que la población control¹⁶³, presentan menor rendimiento y el doble de absentismo laboral, lo que lleva a un coste diario de hospitalización al año del doble frente a la población control de la misma edad¹⁶⁴. Por otro lado, los individuos con SAHS son hipertensos en un 60% frente al 20% de la población control¹⁶⁵. El 50% de las personas que sufren accidentes vasculares cardíacos y cerebrales agudos tienen SAHS con una frecuencia de entre 3-5 veces más que la población de la misma edad que no sufre el síndrome¹⁶⁶. Todo lo anterior indica la elevada prevalencia, morbilidad y mortalidad asociada al SAHS que lo hace un proceso muy importante de salud y donde principalmente la HCI es la que genera las patologías cardiovasculares asociadas y contribuye a las alteraciones metabólicas y neuropsiquiátricas.

Los factores de riesgo de la AOS incluyen pérdida del tono muscular, obesidad, edad avanzada, sexo masculino, menopausia en mujeres, antecedentes familiares de AOS con anomalías craneofaciales, tabaquismo y consumo de alcohol¹⁶¹.

De manera natural, la pérdida del tono muscular de los músculos dilatadores que abren la VAS se acentúa por la atonía durante la fase de sueño REM¹⁴⁹. Se ha propuesto que factores mecánicos que reducen la amplitud de la VAS, y una respuesta pobre de los músculos dilatadores o algún tipo de impedimento en la contracción de los músculos dilatadores de las vías aéreas por parte del SNC llevan a la pérdida periódica de la capacidad de apertura durante el sueño. Además de lo anterior, puede darse una disminución de la actividad del músculo geniogloso que causa la caída de la lengua hacia atrás cerrando la VAS^{143,147,149,167}.

Por otro lado, las personas obesas, tienen alterada la relación entre la pared torácica, el diafragma y los pulmones, limitando la función pulmonar. El sobrepeso está considerado uno de los principales factores de riesgo para la AOS. La prevalencia de AOS en pacientes obesos es muy alta del 50-80% y entre el 60 y 90% de los pacientes con AOS pueden tener sobrepeso¹⁶⁸. La obesidad puede comprimir y/o alterar las propiedades de la VAS por la deposición de tejido graso. Existe una relación lineal positiva entre el índice de masa corporal (IMC) y la gravedad del SAHS, esta relación se debe al aumento de grasa en la región cervical y abdominal¹⁴². Además, la fragmentación del sueño que se asocia al síndrome, está relacionada con una disminución de los niveles de leptina y aumento del apetito que contribuye al sobrepeso.

También, existen diferencias anatómicas como el retrognatismo (tamaño mandibular disminuido), el hueso hioides en posición inferior, o la mandíbula en una posición más retrasada que favorecen la obstrucción¹⁶⁹.

2.4.3 Diagnóstico y tratamiento del SAHS

El método para el **diagnóstico** del SAHS es la polisomnografía (PSG). Esta es una técnica cara y compleja que consiste en la monitorización continua de variables neurofisiológicas y cardiorrespiratorias. El estudio incluye electroencefalograma de las neuronas corticales, EMG de la actividad muscular y electrooculografía del movimiento de los ojos, también medidas de frecuencia cardíaca (FC) mediante electrocardiograma, saturación de O₂ en sangre, esfuerzos respiratorios, cambios de postura durante el sueño, etc. A través de la PSG se valora el trastorno del sueño mediante el número y la repercusión de las apneas y/o hipopneas sobre la estructura del sueño y la función cardiorrespiratoria¹⁷⁰.

El **tratamiento** del SAHS tiene la finalidad de solucionar los síntomas de la enfermedad e incluye diversas medidas:

Medidas higiénico-dietéticas del sueño: entre ellas destacan: la higiene del sueño, pérdida de peso, evitar el alcohol y dejar de fumar.

Presión positiva continua en la vía aérea (CPAP): es el principal tratamiento del SAHS demostrado científicamente, basado en la eliminación de la HCI en los pacientes. Consiste en un aparato que genera un flujo de aire constante que se trasmite a través de tubos a una máscara nasal adaptada y fijada a la cara del individuo (**Figura 14**).

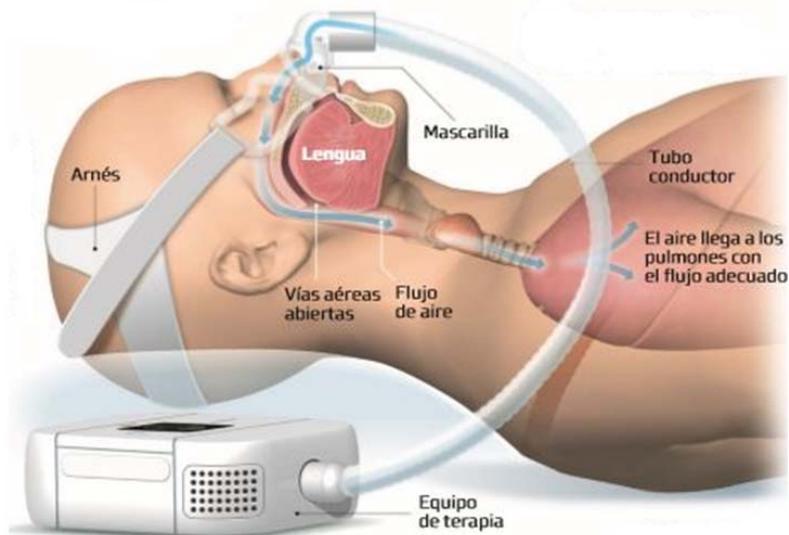


Figura 14: Dispositivo CPAP (Presión positiva continua en la vía aérea) para el tratamiento del SAHS (Tomado ref. ¹⁷¹).

La presión inspiratoria positiva que se transmite a la VAS la estabiliza e impide el colapso, aumentando el diámetro y la capacidad residual funcional¹⁴¹. El uso de la CPAP disminuye la frecuencia de las apneas mejorando la saturación de O₂ durante el sueño¹⁷². Algunos autores muestran que el tratamiento es efectivo en patologías como la hipertensión arterial¹⁷³, además reduce la somnolencia y con ello los accidentes laborales y de tráfico, mejorando la calidad de vida y disminuyendo la mortalidad¹⁷⁴.

Tratamiento quirúrgico: se dividen en dos tipos: las técnicas que reducen el contenido como la palatofaríngea, cirugía nasal y reductora de la base de la lengua, y las técnicas quirúrgicas que aumentan el continente o avance maxilomandibular¹⁷⁵.

Tratamiento farmacológico: actúan aumentando el tono de los músculos dilatadores de la VAS, la mecánica ventilatoria, el umbral de despertar y/o reducen la resistencia de la VAS.

2.5 Fisiopatología del SAHS: Importancia de la hipoxia crónica intermitente (HCI)

Los estudios clínicos¹⁷⁶ y experimentales¹⁷⁷ centran la atención en la importancia de la HCI como el desencadenante de la aparición de las patologías asociadas al SAHS. Por un lado, los eventos obstructivos activan los quimiorreceptores del CC de manera intermitente a lo largo de todas las noches y esto acaba generando un estado de sensibilización de los mismos, causando una activación permanente del sistema nervioso simpático, lo cual parece ser el origen de la patología cardiovascular asociada al SAHS¹⁷⁸⁻¹⁸¹. Por otro lado, estos eventos obstructivos generan oscilaciones en la PaO₂ que simulan eventos de isquemia-reperfusión dando lugar a la producción de ROS. Los ROS producen inflamación y disfunción del endotelio vascular (DE), disminuyendo el fenotipo vasorrelajante y antiadherente, contribuyendo al desarrollo de las patologías cardiovasculares del SAHS^{182,183}. El estrés oxidativo también es el responsable de las alteraciones metabólicas que se dan en el SAHS. Además, el estado de ansiedad producido por el déficit de sueño contribuye al aumento del tono simpático, y también da lugar a las patologías neuropsiquiátricas asociadas a la AOS (**Figura 15**).

El interés en la manipulación correcta del reflejo quimiorreceptor podría ser una diana terapéutica de la patología cardiovascular del SAHS¹⁸⁴. Los mecanismos independientes del reflejo quimiorreceptor también parecen tener un papel importante en esta patología e incluso existen interrelaciones entre los mecanismos dependientes e independientes. Además, los mecanismos moleculares propuestos en la patogenia que son independientes de la activación del CC también se pueden dar en este órgano sensorial. En definitiva, existen múltiples circuitos patogénicos que interaccionan y hacen difícil definir causas y efectos y, por tanto, definir estrategias terapéuticas para las patologías asociadas al SAHS.

Los modelos experimentales de HCI son generados mediante la exposición a episodios de hipoxia respiratoria como ocurre en la enfermedad de la AOS. En 1992, Fletcher y cols. desarrollaron un modelo animal de HCI que consistió en exponer a ratas adultas a ciclos de hipoxia (12s de 3-5%O₂) y aire (15-18s de 21%O₂), 60 episodios/hora, 6-8 h/día, coincidiendo con el tiempo de sueño de los roedores. La exposición de varios días a HI hizo que las ratas sufrieran hipertensión diurna, aumento de la actividad nerviosa simpática y aumento de las CA urinarias, lo cual, se asemeja al fenotipo propio de pacientes con AOS¹⁷⁷. También se observó que la hipertensión se desencadenaba por los episodios hipóxicos, ya que al añadir CO₂ transformando los episodios hipóxicos en hipercápnicos, esta no se modificó. Este modelo experimental de HCI no posee el

esfuerzo respiratorio que vence la obstrucción durante los episodios de apnea que sufren los pacientes, lo que implica que no imita del todo la patología en los humanos. Sin embargo, parece que el aspecto más importante que caracteriza el SAHS es la HCI, la cual, es capaz de generar por si sola hipertensión en los animales de experimentación^{185,186}.

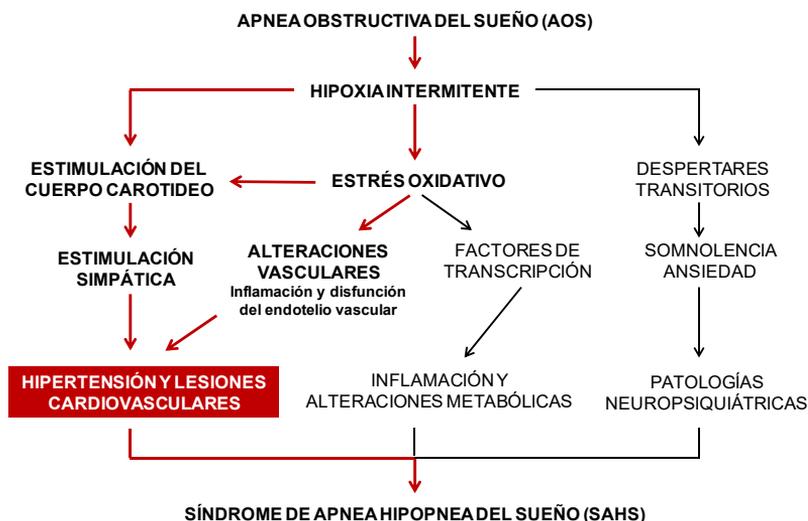


Figura 15. Esquema de las alteraciones que se producen en la AOS y que van a conformar el SAHS. En rojo se indican las vías principales por la que la AOS genera hipertensión y lesiones cardiovasculares (Modificado ref. ¹⁸⁷).

A continuación, de todas las patologías asociadas al SAHS solo se tratará la cardiovascular y más concretamente, la alteración fundamental del síndrome y objeto de estudio de esta tesis: la hipertensión arterial sistémica (HTA).

La PAS disminuye fisiológicamente durante el sueño aproximadamente un 15%. También se ve disminuida la FC, las resistencias vasculares y la actividad del sistema nervioso autónomo (SNA), lo que conduce a un estado de «reposo hemodinámico» con un menor gasto cardíaco. Por el contrario, el sueño REM se caracteriza por aumento en la FC, la actividad del SNA y la PAS. A diferencia de este estado fisiológico en el sistema cardiovascular durante el sueño, las apneas producen un estado hemodinámico que incluye: hipertensión sistémica y pulmonar, disminución del gasto cardíaco e incremento en la poscarga ventricular, alteraciones que son producidas por el despertar, la estimulación simpática, las alteraciones en la presión intratorácica y la hipoxemia e hipercapnia (**Figura 16**). Como consecuencia de lo anterior y del aumento de las CA y otras hormonas (péptido natriurético auricular; ANP, angiotensina II; AII, etc.), la PAS

aumenta de manera cíclica durante el sueño¹⁸⁸. Esta situación termina generando HTA diurna a pesar de tener niveles normales de PaO₂ y PaCO₂.

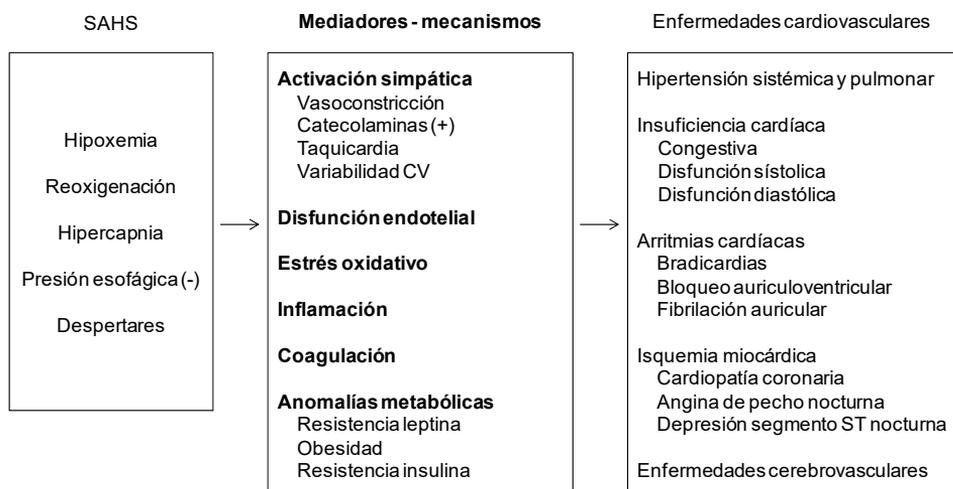


Figura 16. Mecanismos fisiopatológicos del SAHS y enfermedades cardiovasculares. Variabilidad CV: cardiovascular (FC, PAS, gasto cardíaco, etc.) (Modificado ref. ¹⁸⁸).

La HTA es generada en los pacientes con AOS y en los modelos animales experimentales de HCI de manera multifactorial. Los mecanismos que conducen a la HTA se pueden agrupar de manera simple en mecanismos dependientes e independientes de la activación del reflejo quimiorreceptor.

2.5.1 Mecanismos dependientes de la activación del reflejo quimiorreceptor: El papel del CC en los efectos de la HCI

Como ya se ha mencionado, la activación del CC por la hipoxia incrementa la actividad nerviosa de las fibras sensoriales quimiorreceptoras que, vehiculadas en el NSC, se dirigen al núcleo del tracto solitario (NTS), se activan núcleos troncoencefálicos que, a su vez, activan el simpático (respuesta presora) y la ventilación. El CC cumple su importante función homeostática por su gran sensibilidad a la hipoxia. Por tanto, no hay duda de que el CC posee un papel fundamental para detectar los eventos apnéicos que se producen durante el sueño. Pues bien, está demostrado que la HCI produce cambios en la actividad del CC participando en el desarrollo de la HTA en los pacientes con SAHS. Esto se debe a una respuesta quimiorrefleja exagerada que hace que los individuos que padecen AOS presenten elevada actividad simpática y PAS. Los experimentos sobre la respuesta del CC, medida como descargas en el NSC, muestran tras la exposición a HCI un aumento en la descarga de PA basales en normoxia, y

además se ve potenciada la respuesta quimiorrefleja a la hipoxia aguda en comparación con el control¹⁸⁹ (**Figura 17**). Estos resultados indican que la HCI produce una sensibilización del CC a la hipoxia aguda con un aumento de la actividad nerviosa basal y además, esta sensibilización es dependiente del tiempo de exposición a HCI y de la frecuencia del estímulo hipóxico^{190,191}.

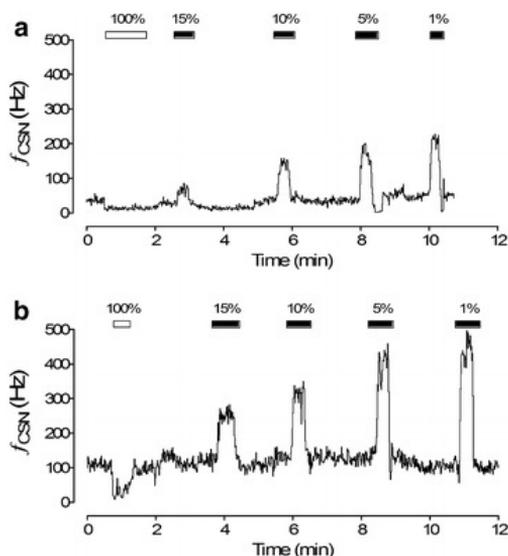


Figura 17. Respuestas quimiosensoriales a varios niveles de O_2 inspirado ($PO_2 \sim 100\text{-}1\%$) medidas en un NSC de una rata control **(a)** y de una rata expuesta a HCI (12episodios/h; 8h/día) durante 21 días **(b)**. f_{csn} , frecuencia de descargas en el NSC expresadas en Hz (Tomado ref. ¹⁶³).

Otro experimento que apoya el papel del CC en los efectos de la HCI consiste en restablecer la ventilación en ambiente normóxico a los animales una vez finalizada la exposición a HCI, lo que revierte la sensibilización de los CC y el aumento basal de las descargas en el NSC. Estos resultados están de acuerdo con estudios realizados en individuos que padecen AOS y son tratados con CPAP¹⁹², en los que se observa una disminución en la PAS. Por otro lado, en experimentos donde se lleva a cabo la ablación y/o denervación del CC de roedores tras la exposición a HCI presentan resultados de disminución de HTA ^{115,120,193-195} y en humanos episodios breves de hiperoxia producen una disminución de la actividad simpática¹⁹⁶. Sobre la morfología del CC, la exposición a HCI en ratas no produce modificaciones significativas excepto en el tamaño de los capilares^{191,197}. Todo ello implica que el CC juega un papel fundamental en los efectos de la HCI sobre el desarrollo y mantenimiento de la HTA.

En resumen, la HCI producida en la AOS provoca una remodelación de la función del CC resultando en dos efectos (**Figura 18**): i. aumento de la respuesta a la hipoxia aguda que implica un aumento en la sensibilidad al estímulo hipóxico; y ii. aumento de la actividad basal de manera prolongada, denominado facilitación sensorial a largo plazo o “sensory long-term facilitation” (sLTF).

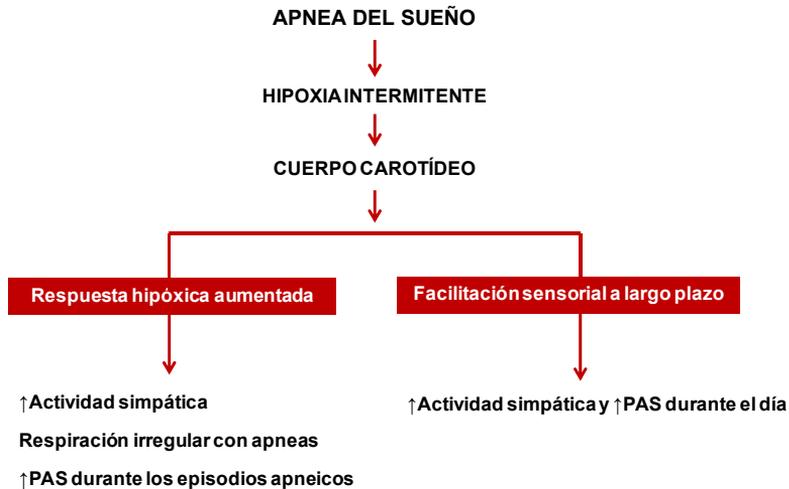


Figura 18. Efectos de HCI en la actividad sensorial del CC y sus consecuencias en la función cardiorrespiratoria (Modificado ref. ¹⁹⁸).

Además de los efectos respiratorios producidos por la acción directa de la HCI sobre el CC existen otras acciones derivadas de la sobreactivación del CC que afecta a otras estructuras implicadas en la actividad simpática: NTS y RVLM y la MA^{198,199} que conlleva al aumento de la PAS (**Figura 19**). Se ha demostrado la implicación de la estimulación simpática y de la MA en los efectos de la HCI mediante la extirpación de la MA en ratas sometidas a HCI²⁰⁰ o simpatectomía química con 6-OH dopamina²⁰¹, lo cual provoca la disminución de la liberación de CA y de la PAS. Por otra parte, las preparaciones *in vitro* de MA o los cultivos de células cromafines procedentes de ratas expuestas a HCI presentan una respuesta secretora de CA ante la hipoxia que está ausente en las procedentes de animales controles²⁰².

De esta forma se refuerza la hiperactivación refleja del simpático que, junto con la activación del sistema renina-angiotensina (RAS), contribuyen a la hipertensión producida por la HCI^{203,204}. También se ha descrito que la HCI, además de aumentar la actividad de los quimiorreceptores, disminuye la actividad barorrefleja favoreciendo el aumento de la actividad simpática^{120,189,205}.

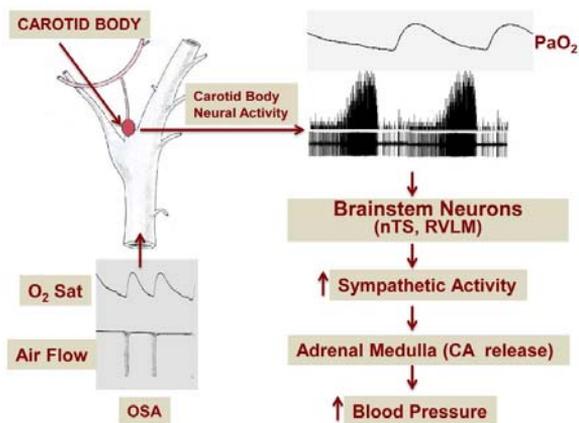


Figura 19. Esquema del reflejo quimiorreflejo del CC que contribuye a la hipertensión causada por la AOS (Tomado ref. ¹⁹⁹).

Por otro lado, hay mecanismos independientes de la activación del CC donde la HCl produce un efecto directo a través del estrés oxidativo en los principales niveles del reflejo quimiorreceptor: NTS y RVLM, la MA y sobre el propio CC.

Mecanismos implicados en la respuesta quimiorrefleja inducida por HCl

La HCl genera eventos de hipoxia-reoxigenación similares a los que ocurren en procesos de isquemia-reperfusión. En la reoxigenación se produce un incremento de la generación de ROS, los cuales parecen estar implicados en la respuesta quimiorrefleja exagerada inducida por la HCl. Los experimentos realizados en roedores tras la exposición a HCl desvelan concentraciones elevadas de ROS en las principales estructuras del reflejo quimiorreceptor: CC, NTS y RVLM y la MA¹⁹⁸. El aumento de ROS se debe a un desequilibrio entre los enzimas prooxidantes que los forman y los enzimas antioxidantes que los degradan, principalmente a través del aumento de los enzimas prooxidantes NADPH-oxidasa-2 (NOX2) y xantina oxidasa (XO) y la disminución del enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD2)²⁰⁶. La importancia de la producción de ROS inducida por la HCl, que a su vez genera más ROS, se observa con el uso de antioxidantes en ratas durante la exposición a HCl. Los resultados de este estudio no muestran aumento en los niveles de ROS, ni tampoco sobreactividad del CC, niveles altos de CA circulantes e HTA^{189,198}.

El proceso que lleva al desequilibrio en la expresión de enzimas prooxidantes y antioxidantes por aumento de ROS, implica cambios transcripcionales sobre la familia de HIF, regulador de multitud de genes²⁰⁷. Existen dos isoformas: HIF-1 (heterodímero de HIF-1α y HIF-1β) y HIF-2 (heterodímero de HIF-2α y HIF-1β). El incremento de ROS

generado por la HCl produce un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, que conduce al desequilibrio entre la formación de las isoformas de HIF, aumentando el nivel de la isoforma HIF-1 α y disminuyendo el de HIF-2 α ^{199,208,209} (Figura 20).

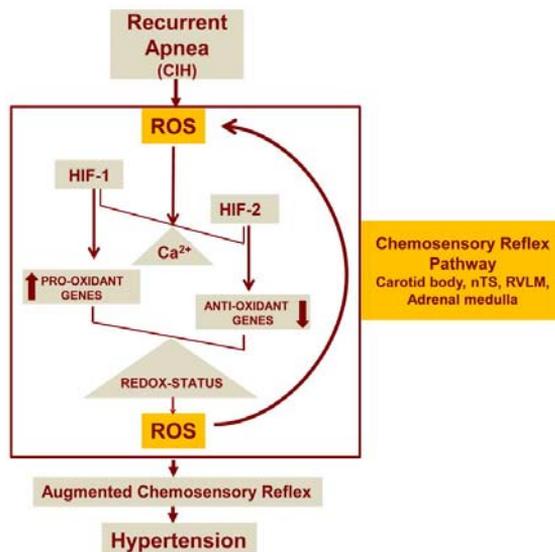


Figura 20. Esquema de la desregulación de HIF-1 y HIF-2 por HCl como resultado de la apnea recurrente y la regulación de los ROS en la vía del reflejo quimiosensorial del CC (Tomado ref. ¹⁹⁹).

HIF-1 es responsable de la síntesis de enzimas prooxidantes, como NOX2, y está presente en el CC, a nivel central (núcleos troncoencefálicos) y periférico (MA)^{202,210}. También, los ROS generados por la actividad de NOX2 inhiben el complejo I de la cadena mitocondrial, aumentando la producción de ROS, lo que quiere decir que los propios ROS generan más ROS retroalimentando el sistema²¹¹. La importancia de HIF-1 α se demuestra a través del bloqueo farmacológico o genético (HIF-1 $^{-/-}$) de su actividad, lo cual elimina el aumento de ROS mediado por la HCl²¹².

Por el contrario, la HCl produce la degradación de la isoforma HIF-2 α a través de la proteasa calpaína en las principales estructuras del reflejo quimiorreceptor. La degradación conlleva la disminución de enzimas antioxidantes, como la SOD2, produciendo un aumento de ROS¹⁹⁸. Se observan características fenotípicas similares entre ratones expuestos a HCl y ratones con déficit parcial de HIF-2 α ²⁰².

En definitiva, la HCl produce un incremento del cociente HIF-1/HIF-2, favoreciendo la síntesis de enzimas prooxidantes en perjuicio de los enzimas antioxidantes, siendo este el mecanismo molecular responsable de la generación de los ROS inducido por la HCl que genera estrés oxidativo y contribuye a la génesis de la HTA¹⁹⁹.

Por otro lado, existen estudios en modelos animales expuestos a HCl que demuestran la existencia de otros mediadores de los efectos de la HCl en el CC como son: endotelina 1 (ET-1), citoquinas pro-inflamatorias, AII y 5-HT.

Se ha descrito que la HCl produce el aumento de la expresión de ET-1, un péptido vasoconstrictor, en las CQ de CC de gato^{213,214} y rata¹⁹⁷ y que la utilización de antagonistas del receptor de la ET-1 elimina la sensibilización del CC por HCl^{213,214}. Experimentos en rata demuestran que el aumento de ET-1 se produce aproximadamente durante la primera semana de HCl, y luego disminuye hasta valores normales, contribuyendo a la sensibilización del CC al principio de la exposición a HCl¹⁹⁷. Sin embargo, otros estudios muestran que el aumento de la expresión de ET-1 por HCl no se debe al aumento del precursor de ET-1 si no a un aumento de la activación del enzima conversor de preproendotelina-1 (ECE) y que se suprime con el uso de antioxidantes, sugiriendo que los ROS median dicho efecto. Además se ha descrito que la HCl induce la liberación de ET-1 y el aumento de expresión del receptor favoreciendo la sensibilización del CC a la hipoxia²¹⁵.

También se ha demostrado que la ET-1 y la actividad de ECE están aumentadas en el seno carotideo (pequeña dilatación del tracto de salida de la arteria carótida interna, en la bifurcación de la carótida común, donde se localizan un gran número de barorreceptores que se activan con el estiramiento de la arteria cuando aumenta la presión arterial) y como consecuencia el reflejo barorreceptor está disminuido tras la exposición de la HCl. Los experimentos realizados en ratas tras la HCl muestran un reflejo barorreceptor deprimido que se recupera con el uso de antagonistas del receptor ET-1. Por tanto, el aumento en la actividad de los quimiorreceptores y la disminución de la sensibilidad de los barorreceptores, en modelos animales de HCl y en individuos con AOS, produciría una mayor actividad simpática ante estímulos hipóxicos dando lugar finalmente a la hipertensión^{205,216}.

La HCl en el CC también produce incremento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias como: interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-1 β (IL-1 β), factor nuclear kB (NF-kB) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Sin embargo, el tratamiento con ibuprofeno tras la HCl demuestra que estas citoquinas no afectan a la sensibilización del CC al mantenerse incrementada la respuesta hipóxica²¹⁷, lo que indica que la inflamación en este nivel no tiene un papel crucial.

Por otro lado, el CC contiene 5-HT y AII, esta última sintetizada vía ROS que produce un incremento de AII y de sus receptores²¹⁸. La 5-HT y la AII se proponen como

mediadores del proceso de sLTF ya que su aplicación en determinados momentos favorece la sLTF del CC¹⁹⁰.

Todos estos estudios indican que el aumento de la producción de ROS es un mecanismo implicado en el reflejo quimiorreceptor del CC contribuyendo a la sobreactivación simpática y como consecuencia a la hipertensión producida por la HCl¹⁹⁹.

Además, se propone a los transmisores gaseosos: CO y H₂S, un papel importante en la detección de la PaO₂ y en la regulación de la actividad del CC en la AOS^{77,219,220}. Existen estudios que demuestran que la señalización mediada por CO y H₂S puede dar lugar a un aumento de la RVH, hipersensibilidad del CC a la hipoxia e HTA^{219,220} basado en las siguientes observaciones:

Papel del CO: los ratones modificados genéticamente con delección de HO-2 (HO-2-/-) presentan niveles de CO bajos y como consecuencia RVH aumentada y alto IAH durante el sueño, como se observa en pacientes con SAHS. El efecto es revertido con un donador de CO, CORM-3.

Papel del H₂S: en ratones con doble delección genética de CSE y HO-2 y (CSE-/- HO-2-/-) no se produce H₂S y se observa una respiración sin apneas, además de ausencia de hipersensibilidad del CC ante la hipoxia. La administración de L-proparglicina (L-PAG), inhibidor de la síntesis de H₂S a través del CSE, en ratones HO-2-/- disminuye el IAH y la respuesta del CC a la hipoxia. Por último, en un estudio realizado en SHR, las cuales presentan una respuesta aumentada del CC ante la hipoxia, el uso de L-PAG hace que la respiración se normalice, el IAH disminuya y también consigue bajar la PAS.

2.5.2 Mecanismos independientes de la activación del reflejo quimiorreceptor: Disfunción del endotelio vascular

Entre los mecanismos independientes del CC se propone que la HCl actúa directamente sobre estructuras periféricas independientemente de las modificaciones en el reflejo quimiorreceptor que tiene su origen en el CC. Algunos autores^{149,221} proponen la DE como parte responsable de las alteraciones cardiovasculares en el SAHS. Además, la DE está relacionada con el incremento de rigidez arterial, algo característico de los individuos con SAHS²²².

El endotelio vascular está formado por una monocapa de células que recubre el interior de los vasos sanguíneos. Esta capa cumple las siguientes funciones: selectividad en el paso de sustancias y nutrientes, liberación de factores con funciones activas, como

el NO que es un potente vasodilatador o la ET-1 que tiene acción vasoconstrictora, y algunos factores de la coagulación, de adhesión de moléculas y fibrinólisis. La DE se genera por un desequilibrio entre las sustancias vasoconstrictoras y vasodilatadoras que secreta el endotelio y como consecuencia se produce un aumento del tono muscular vascular, un aumento de las moléculas de adhesión de leucocitos, agregación plaquetaria y mayor tendencia a la trombosis²²³.

Por tanto, la DE consiste en un fenotipo vasoconstrictor, proadhesivo y procoagulante adquirido por el endotelio, siendo el estrés oxidativo, las desregulaciones metabólicas y la inflamación los factores principales de su origen. Debido al proceso de hipoxia/reoxigenación producido en la HCl se genera un aumento de ROS y se activan mecanismos propios de la inflamación de manera generalizada (**Figura 21**). La vasoconstricción resultante puede llevar a alteraciones cardiovasculares adversas asociadas con la AOS como la HTA.

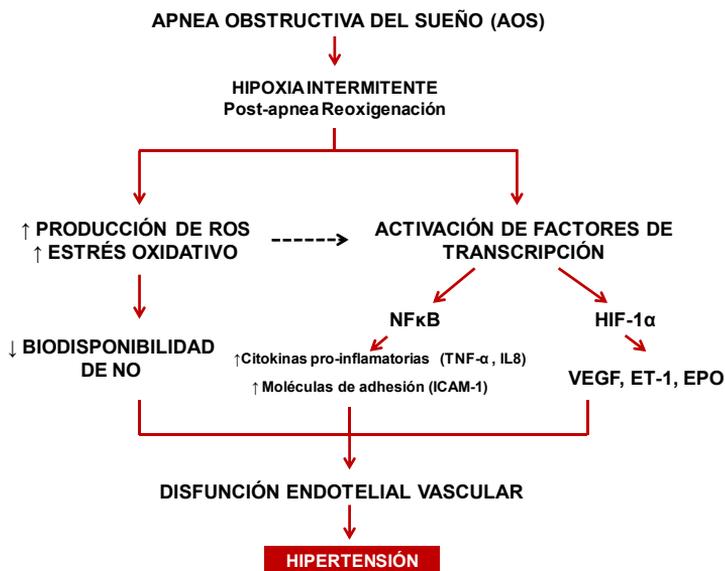


Figura 21. Esquema de los factores que intervienen en el daño endotelial vascular producido por la HCl en la AOS (Modificado ref. ^{224,225}).

Estrés oxidativo endotelial inducido por HCl

Como ya se ha mencionado, la desregulación de las isoformas HIF por la HCl es el mecanismo molecular implicado en el aumento de la producción de ROS debido al desbalanceado entre enzimas pro y anti-oxidantes. Los mecanismos que generan ROS de forma generalizada durante la HCl son los mismos que suceden en el CC (**Figura 20**).

Existen estudios que muestran un aumento en diferentes biomarcadores de estrés oxidativo en muestras de aire exhalado, orina, plasma y células procedentes de individuos con SAHS²²⁶. También se observa una menor capacidad vasodilatadora en la arteria braquial²²⁷ y su recuperación con antioxidantes, lo que indica que el estrés oxidativo contribuye al aumento del tono vascular en pacientes con SAHS.

Inflamación en el endotelio por HCl

El aumento de los ROS que se produce en la HCl induce cambios en la regulación del factor de transcripción NF- κ B. El factor HIF-1 α puede modular NF- κ B, un factor de transcripción fundamental implicado en la regulación de genes inflamatorios debido a cambios en el estado de oxidación-reducción celular^{221,228}. Una vez producida la activación de los procesos oxidativos en el interior celular, NF- κ B se transloca al núcleo por fosforilación de la subunidad inhibidora I- κ B²²⁹. Este factor de transcripción puede activarse en células endoteliales, leucocitos y plaquetas y regular la transcripción de una serie de genes proinflamatorios que producen la síntesis de quimioquinas, citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-8), moléculas de adhesión (ICAM-1) y enzimas como ciclooxigenasa-2 (COX-2) las cuales contribuyen a la DE y a la hipertensión relacionada con la HCl²³⁰. Por ejemplo, las citoquinas inflamatorias TNF- α e IL-8 están relacionadas con la aterogénesis en la AOS al inducir la expresión de moléculas de adhesión²³¹.

Por otro lado, los niveles en suero de la proteína C-reactiva (PCR), marcador universal de inflamación, se ven aumentados en el SAHS y se correlaciona con el IAH^{183,232}. Sin embargo, con el tratamiento de la AOS con CPAP se observan niveles diferentes de la proteína y, por tanto, no aclara su participación en la patogénesis del SAHS²³³⁻²³⁵.

Desregulación metabólica y disfunción endotelial

La HCl y los ROS aumentan el colesterol total, el ligado a lipoproteína de baja densidad (LDL) y el nivel de LDL oxidadas (OxLDL), favoreciendo la formación de placas de ateroma²³⁶. También se observa que la peroxidación lipídica es mayor en pacientes con AOS debido al aumento de ROS²³⁷. El estrés oxidativo generado por la HCl puede conducir al daño endotelial dando lugar a la aterosclerosis²³⁸. Además, los ROS pueden aumentar la producción de moléculas de adhesión en el endotelio, disminuir la actividad de la NOS y promover la degradación del NO²³⁹. Por ejemplo, en células endoteliales aisladas las OxLDL inhiben la captación de arginina (precursor de NO) y la expresión de la NOS endotelial y aumentan los niveles del inhibidor de la NOS, la dimetil arginina asimétrica (ADMA)²⁴⁰.

Factores vasoactivos implicados en la HCI

El endotelio genera una serie de mediadores vasoactivos. Un equilibrio entre estos mediadores, que incluyen factores vasoconstrictores (ET-1, RAS y tromboxano) y factores vasorrelajantes (NO y prostaciclina), se cree que median la homeostasis, el tono vascular fisiológico y la reparación de la lesión vascular. Sin embargo, una alteración en este equilibrio puede cambiar las propiedades y el tono vascular, promoviendo la vasoconstricción e impidiendo la vasorrelajación dependiente del endotelio.

Óxido Nítrico

Un mecanismo que desencadena la DE en el SAHS implica menor disponibilidad de NO, lo cual está relacionado con la aterogénesis. El NO es un potente vasodilatador cuya producción está regulada por la acción de la NOS. Este enzima cataliza la oxidación del aminoácido L-arginina para producir NO y L-citrulina. Hay 3 isoformas de la NOS: eNOS (endotelial), nNOS (neuronal) e iNOS (inducible). La eNOS y la nNOS son enzimas constitutivas, que producen cantidades pequeñas de NO en períodos cortos de tiempo, estimuladas por el ADP, el ejercicio crónico, la hipoxia, el estrés de la pared vascular, etc. La isoforma iNOS no se expresa en condiciones fisiológicas, pero es inducida por citoquinas como el $TNF\alpha$ y endotoxinas, generando cantidades elevadas de NO durante períodos largos de tiempo²²³.

El NO endotelial es un regulador clave de la homeostasis vascular ya que difunde a la capa muscular donde produce vasorrelajación a través del aumento de cGMP en las células musculares lisas, inhibe la proliferación de las propias células musculares lisas y la adhesión de monocitos al endotelio y la activación y la agregación plaquetaria previniendo la aterogénesis.

La HCI que se produce en pacientes con AOS influye directamente en la síntesis de NO en el endotelio vascular²⁴¹. En cultivos de células endoteliales se observa que la medida de la eNOS y de la enzima fosforilada (P-eNOS) es menor en células endoteliales procedentes de sujetos con AOS que en las células de los controles, mientras que la expresión de distintos marcadores inflamatorios y de ROS es mayor, y estos efectos se revierten con el tratamiento de CPAP¹⁸². Además, los niveles de NO circulante, determinados midiendo los nitritos y nitratos séricos derivados del NO, disminuyen en los sujetos con AOS frente a los controles, y siguiendo la terapia con CPAP los niveles normales se restablecen^{242,243}.

Entre los mecanismos que producen una menor disponibilidad de NO en la HCI, se encuentran los ROS generados por el aumento de NOX2 inhibiendo directamente la

expresión de eNOS^{244,245}. Además, la producción de aniones superóxido ($O_2^{\bullet-}$) reaccionan con el poco óxido nítrico (NO^*) y forma peroxinitrito ($O_2^{\bullet-} + NO^* \rightarrow ONOO^-$) impidiendo la actividad del NO y conduciendo a la generación de la hipertensión²⁴⁶. El $ONOO^-$ produce nitrotirosina por nitrosilación de residuos de tirosina en las proteínas alterando su función, como sucede en la aconitasa mitocondrial. En concreto, se observa en vasos cutáneos de pacientes con SAHS un alto nivel de nitrosilación²⁴⁷.

Además, la hipoxia aumenta la actividad de la arginasa II en las células endoteliales, que degrada el aminoácido L-arginina, sustrato esencial de la eNOS para la producción de NO²⁴⁸.

Otro mecanismo que produce disminución en la disponibilidad de NO en la HCl es la presencia de altos niveles de inhibidores endógenos de la eNOS como análogos estructurales de la arginina (derivados metilados)^{249,250}. En las células, los residuos de arginina de las proteínas pueden ser mono o dimetilados por enzimas específicos, las proteínas arginina metiltransferasas (PRMT). Como resultado de la proteólisis intracelular se liberan arginina y sus análogos metilados: monometilarginina (MMA), dimetil-arginina simétrica (SDMA) y ADMA que pueden detectarse tanto en suero como en orina. Los derivados metilados son degradados por las dimetilarginina dimetilamino hidrolasa (DDAH) y su concentración está regulada por la velocidad de su síntesis y degradación y por sus transportadores (CAT) (**Figura 22**).

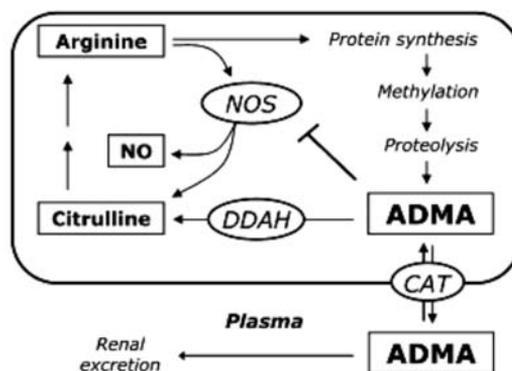


Figura 22. Génesis y degradación de los análogos de arginina.²⁵¹

Diversos estudios y trabajos muestran que los ROS y la inflamación aumentan la expresión de PRMT, inhiben la expresión de DDAH y aumentan los niveles de ADMA, y además, estos efectos se revierten por el uso de antioxidantes²⁵²⁻²⁵⁴. En condiciones fisiológicas los análogos metilados de la arginina están presentes en bajas concentraciones, pero en algunas situaciones patológicas, pueden aumentar lo suficiente

como para disminuir la síntesis de NO. Puesto que la ADMA ejerce una acción inhibitoria sobre la eNOS, se entiende que una concentración alta de la misma bloquearía la generación de NO en el endotelio vascular, contribuyendo a que el endotelio pierda su fenotipo vasodilatador y antiadherente.

Endotelina-1

La ET-1 es una sustancia vasoconstrictora que también produce el endotelio y parece estar incrementada en sujetos con AOS e influye en la HTA asociada. Los estudios realizados claramente apoyan un papel para los ROS en la hipertensión inducida por HCl. De hecho, la administración de un mimético de la SOD (tempol) previene los aumentos inducidos por la HCl en los niveles plasmáticos de ET-1 y la presión sanguínea¹⁸⁵.

La hipoxia induce la transcripción de ET-1 en varios tipos de células, incluidos los cardiomiocitos y las células endoteliales²⁵⁵⁻²⁵⁷. Además, los ROS aumentan los niveles de ARNm y del péptido ET-1 en células endoteliales, de músculo liso²⁵⁸ y, como ya se ha mencionado, en CQ de CC. De acuerdo con el papel de ET-1 como contribuyente a la hipertensión inducida por HCl, la administración crónica de un bloqueante del receptor ET_A (BQ123) previene el aumento en la PAS inducido por HCl en ratas²⁵⁹.

Un estudio realizado en arterias de ratas expuestas a HCl muestra un aumento selectivo de la reactividad vasoconstrictora frente a ET-1²⁶⁰. Las vías de señalización intracelular que intervienen en la vasoconstricción de ET-1 se alteran en la exposición a HCl en comparación con las ratas controles, mientras que los mecanismos que intervienen en la constricción de la fenilefrina no se modifican²³⁰.

Sistema renina-angiotensina

Los ROS también pueden aumentar la síntesis de angiotensinógeno que contribuye a la activación de RAS^{261,262}. Por otro lado, la AII al aumentar la producción de ROS conduce a la regulación positiva de ET-1^{263,264}. Por lo tanto, los ROS no solo están implicados activando estos sistemas sino también como parte de la señalización aguas abajo de ambos ET-1 y AII en la pared vascular²³⁰.

El papel de la AII en la hipertensión observada en animales expuestos a HCl y en pacientes con AOS sigue siendo controvertido. Algunos estudios demuestran claramente la activación de RAS en animales²⁶⁵ y pacientes con AOS²⁶⁶. Sin embargo, otros estudios no muestran cambios en los componentes de RAS en pacientes con AOS^{267,268} y tampoco la administración de un inhibidor del receptor de AII (losartan) previene la hipertensión inducida por la HCl en ratas¹⁸⁶. Aunque la AII puede no estar actuando

como un agente presor, los niveles plasmáticos elevados en pacientes con AOS parecen contribuir a los aumentos en los niveles plasmáticos de VEGF²⁶⁶. VEGF es una potente citoquina angiogénica que también contribuye a la aterogénesis. Por lo tanto, es posible que la AI a través del VEGF contribuya a la angiogénesis, la reparación del endotelio y la aterosclerosis más que a la hipertensión asociada a la AOS²³⁰.

En conclusión, la HCI produce aumento de la producción de ROS, inflamación y daño endotelial en modelos animales. En un trabajo previo en nuestro laboratorio hemos observado que los ROS son unos mediadores principales en la patogénesis de las comorbilidades presentes en el SAHS¹⁸³ que, junto con la sensibilización del CC en la HCI, contribuyen al aumento de la actividad simpática y al desarrollo de patologías cardiovasculares.

2.6 El envejecimiento como protección de los efectos de la HCI

La relación que puede llegar a existir entre el SAHS y la edad resulta compleja debido a que los síntomas propios de la enfermedad en personas de edad avanzada, podrían pasar inadvertidos por falta de atención de los mismos. Por ejemplo, un síntoma característico de la AOS es la somnolencia diurna, algo normal en personas de edad avanzada. Por otro lado, a medida que avanza la edad las patologías cardiovasculares que se asocian a la AOS pierden su vínculo, aunque el IMC aumenta con la edad y también los trastornos metabólicos asociados a la AOS. Se puede decir que en individuos de edad avanzada la prevalencia del SAHS es mayor que en los jóvenes, sin embargo, los síntomas del SAHS son más evidentes en las personas de mediana edad que en los mayores de 65 años²⁶⁹.

En estudios sobre mortalidad entre individuos de edad avanzada con AOS con individuos que no la padecen, se observa paradójicamente que los que padecían AOS tienen menor mortalidad, y además presentan mejoría los que padecen AOS moderada. Esto lleva a pensar que el SAHS produce algún tipo de protección, sugiriendo que de alguna forma el estrés oxidativo disminuye²⁷⁰. En este sentido, nuestro laboratorio realizó un estudio comparativo de los efectos de la HCI en ratas jóvenes (3 meses) y viejas (20 meses), junto con sus controles de la misma edad, centrado en los niveles de estrés oxidativo generado por la HCI^{183,269}. Anteriormente se había observado que la respuesta quimiorreceptora a la hipoxia era menor en las ratas viejas²⁷¹, dando lugar a una relación de causalidad.

De manera resumida, los resultados de ese estudio muestran que la HCl en las ratas jóvenes aumenta la respuesta hipóxica del CC medida como actividad en el NSC, las CA circulantes, el contenido y la síntesis de las CA de la arteria renal y produce un estado oxidativo causando hipertensión. Sin embargo, en ratas viejas la HCl no altera la actividad en el NSC, ni los parámetros medidos relacionados con las CA, ni el estado redox, y finalmente no cambia su PAS.

Los resultados obtenidos en ratas viejas expuestas a HCl indican que los procesos plásticos, adaptativos o no adaptativos²⁷² que se producen en el tronco encefálico de animales adultos jóvenes y que conducen a la hipertensión no se producen en los animales envejecidos. La exposición a HCl tampoco altera ninguno de los parámetros redox medidos en la dirección prooxidativa, indicando que los animales viejos toleran la HCl aparentemente sin ninguno de los efectos deletéreos desencadenados por los ROS¹⁸³. Parece que hay una leve sensibilización de los quimiorreceptores del CC, pero no hay un aumento del tono simpático, y no hay hipertensión sostenida, todos ellos procesos en los que participan los ROS²⁷². El estudio no muestra ningún signo de que la HCl cause estrés oxidativo en los animales de edad avanzada. Como ya se ha mencionado, las oscilaciones en la PaO₂ producidas por las obstrucciones durante el sueño representan un evento generador de ROS, particularmente en las células endoteliales^{270,273}. De modo que si no hay generación de daño oxidativo, no cabría esperar que la HCl causara daño endotelial y remodelación permanente de los vasos sanguíneos en los animales viejos. Recientemente se ha observado que las exposiciones transitorias y prolongadas a H₂O₂ son mejor toleradas por las células endoteliales de las ratas adultas que de las ratas jóvenes²⁷⁴.

Este estudio muestra que el envejecimiento proporciona una protección contra los efectos nocivos producidos por la HCl en animales jóvenes y que esta protección proviene de dos vías importantes en la génesis de las comorbilidades asociadas a la HCl: ausencia del tono simpático aumentado y de estrés oxidativo. Esto lleva a la necesidad de más estudios sobre los mecanismos celulares y moleculares que ocurren durante el proceso de envejecimiento normal y la resistencia a la aparición de patologías asociadas con la AOS.

Hipótesis y objetivos

3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El CC tiene un papel fundamental en la génesis de las modificaciones que participan en el SAHS debido a la activación y sensibilización de este órgano quimiorreceptor. Dichos fenómenos conducen a la activación secuencial de centros nerviosos troncoencefálicos y del simpático que tratarán de mantener la homeostasis del organismo al aumentar la ventilación y generar una respuesta vasopresora adecuada para asegurar la supervivencia. Sin embargo, su activación permanente produce efectos adversos que conducen a la hipertensión sistémica. Por otra parte, otros mecanismos independientes de la activación y sensibilización del CC se han propuesto como mecanismos patogénicos que también conducen a la hipertensión a través fundamentalmente de la disfunción endotelial.

En este trabajo nuestra hipótesis se basa en que la falta de respuesta a la hipoxia del CC en el cobaya suprimiría la sensibilización quimiorrefleja y, por tanto, atenuaría o eliminaría los efectos respiratorios, simpáticos y cardiovasculares debidos a la HCI dependientes de la activación del CC. Esta caracterización confirmaría poder utilizar esta especie como control negativo de la participación del CC en la generación de la hipertensión producida por la HCI. Por otro lado, el hecho de que estudios previos muestran una respuesta quimiorreceptora menor en el envejecimiento tras la HCI implicaría que todos los efectos dependientes del CC deberían estar atenuados en las ratas envejecidas.

Por tanto, el **objetivo general** es caracterizar y comparar los efectos cardiovasculares de la HCI en dos modelos animales, el cobaya y la rata envejecida, cuyos cuerpos carotídeos presentan algún tipo de alteración funcional.

El objetivo general puede desglosarse en los siguientes **objetivos específicos**:

1. Analizar los efectos de la HCI sobre la actividad de los quimiorreceptores del cuerpo carotídeo y el reflejo ventilatorio en el cobaya y en la rata vieja.
2. Evaluar la actividad simpática y el reflejo cardiovascular subsecuente a la HCI en el cobaya y en las ratas viejas.
3. Valorar el papel de la dopamina como mediador de los efectos de la HCI dependientes de la activación del cuerpo carotídeo.
4. Comparar los efectos de la HCI y la HCS sobre la presión arterial pulmonar en el cobaya y en la rata.

5. Evaluar la respuesta vasomotora y la función endotelial sistémicas y pulmonares y su posible alteración por la HCl en el cobaya y en la rata vieja.

Para lograr estos objetivos utilizaremos protocolos estándar de hipoxia intermitente como modelo de AOS en los siguientes animales de experimentación: rata joven y vieja y cobaya joven. Existen muchos modelos experimentales de HI generados en los distintos laboratorios de investigación; estas diferencias se deben a: porcentaje de O₂ en los episodios de hipoxia, duración de la hipoxia, ciclos de hipoxia a la hora, días de exposición y especies de animales utilizadas. El protocolo de HI para generar el modelo animal utilizado en este trabajo intenta simular los ciclos de HI que presentan los pacientes con AOS. Durante las 8h del periodo de sueño del roedor los animales se exponen a ciclos que constan de 40 s de hipoxia hasta el 5%O₂ seguido de 80 s de aire. Según el IAH se clasificaría como una AOS entre moderada (IAH<30) y severa (IAH>30). La duración de la exposición a HI es de 15 días en las ratas y 30 días en los cobayas.

Material y métodos

4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Modelos animales y diseño experimental

Los protocolos y procedimientos experimentales diseñados para este trabajo, fueron autorizados por el Comité de Ética en Experimentación y Bienestar Animal (CEEBA), Órgano Encargado del Bienestar de los Animales (OEBA) de la Universidad de Valladolid.

Los animales utilizados en el presente trabajo han sido:

- Ratas macho de raza Wistar, de edades distintas: 3-4 meses (3M), tiempo suficiente para que las ratas alcancen el estado adulto con un peso aproximado de 250-350g, y 20-22 meses (20M) para las ratas consideradas viejas con un peso entre 750-850g. Estos animales fueron criados en el animalario de la Universidad de Valladolid en la Facultad de Medicina.

- Cobayas macho de la cepa Hartley (Charles River Laboratories, Francia), los cuales se compraron cuando tenían 1 mes de edad y se les mantuvo en el animalario de la Universidad de Valladolid hasta los 3 meses, momento en que alcanzan los 650-750g de peso.

Todos los animales estuvieron en condiciones controladas de humedad y temperatura, con ciclos de luz-oscuridad de 12 h, cumpliendo la legislación vigente sobre bienestar animal (Real Decreto 53/2013, Artículo 6). Fueron alimentados con dieta estándar propia para cada especie (ssniff Spezialdiäten GmbH, Alemania) y agua *ad libitum*. Los cobayas son animales que no sintetizan la vitamina C por lo que hubo que suplementar el agua de bebida con esta vitamina (Farma Bayer S.A., España), a una concentración de 1g/L, para evitar una avitaminosis.

En este trabajo se han utilizado 73 cobayas, 78 ratas 3M y 38 ratas 20M, los cuales, cuando se encontraron en la edad adecuada se dividieron aleatoriamente en dos grupos: Controles (C) y Experimentales o sometidos a hipoxia crónica intermitente (HCI). Un grupo de ratas de 3 meses de edad, C e HCI, se seleccionó para el estudio del efecto crónico del fármaco domperidona, un antagonista dopaminérgico, administrado en el agua de bebida. Además, se realizó un grupo independiente de cobayas sometidos a hipoxia crónica sostenida (HCS), para comparar algunos efectos producidos entre la HCI y HCS (**Figura 23**).

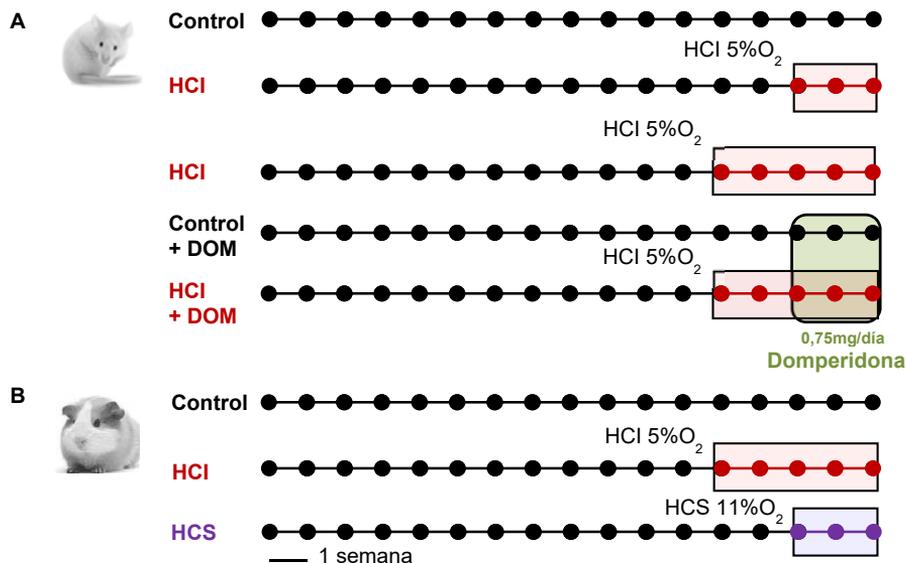


Figura 23. Grupos y protocolos experimentales de hipoxia: **A.** Ratas 3M y 20M Control; Ratas 3M y 20M HCl: animales expuestos a HCl (5%O₂), 8h/día, durante las 2 últimas semanas antes de los experimentos; Ratas 3M HCl: animales expuestos a HCl (5%O₂), 8h/día, durante 4 semanas; Ratas 3M C y otro HCl suplementados con domperidona (0.75mg/día) en el agua de bebida durante las 2 últimas semanas antes de los experimentos. **B.** Cobayas Control; Cobayas HCl; animales expuestos a HCl (5%O₂), 8h/día, durante las 4 últimas semanas antes de los experimentos; Cobayas HCS: animales expuestos a HCS (11%O₂), 24h/día, durante las 2 últimas semanas antes de los experimentos.

El protocolo que se siguió para la disolución y preparado de la solución de bebida con domperidona fue el siguiente: una vez pesada se le añade HCl 0.1N para bajar el pH, se calienta a 37°C y se agita vigorosamente; a continuación, se añade NaH₂PO₄ 0.01M para subir el pH a 6.5-7.0. De este modo el fármaco disuelto puede ser usado en el agua de bebida calculando el volumen que se debe añadir para administrar la concentración deseada. La cantidad diaria administrada durante 15 días fue de 0.75mg de domperidona.

Hipoxia crónica intermitente (HCl)

La exposición a la HCl se llevó a cabo en un laboratorio independiente y de uso exclusivo para este tratamiento. Se utilizaron cámaras (34 x 28 x 20cm) de metacrilato transparente con cierre hermético, en las cuales se introducían los animales (4 cobayas o 4 ratas por cámara) en tandas independientes, es decir, sin coincidir en el tiempo la exposición de la HCl de ratas y cobayas. Se dispone de 4 cámaras por lo que el máximo de animales expuestos a HCl en cada tanda es de 16. Las cámaras están provistas de

varias aberturas, una corresponde a la entrada del gas y en el lado contrario se disponen dos aberturas, una donde va colocado un analizador de O_2 (Sensor Oxyding, Drager, Alemania) y otra por donde se produce la salida de los gases impidiendo de esta forma el incremento de la presión en la cámara.

El sistema empleado para conseguir la composición y flujo de gases conveniente está compuesto por dos partes: un autómata (SIEMENS LogoiPower GEP1332) que, dependiendo del momento del ciclo de la HI en el que se encuentre, comanda un sistema de 3 válvulas controlando la apertura y cierre de una mezcla de gases (aire y N_2). Con la válvula 1, conectada a un tanque que contiene N_2 , se consigue una hipoxia del 5% O_2 el punto más bajo del ciclo; con la 2, conectada a un tanque de aire con un flujo alto, se restablecen los valores de normoxia (20-21% O_2) en muy poco tiempo y con la válvula 3, conectada al mismo tanque de aire que la válvula 2 pero el flujo es menor, se mantiene el 21% O_2 hasta que comienza un nuevo ciclo; y un sistema para monitorizar los cambios en el porcentaje de O_2 en el interior de la cámara de HI a través de un analizador de O_2 . El registro puede verse en cada momento, durante las 8h de exposición a HI, a través de un programa de adquisición de datos.

El protocolo de exposición de la HCI (**Figura 24**) consistió en ciclos de 40s de hipoxia (para alcanzar el punto más bajo de 5% O_2 momento en el que comienza a entrar aire) seguido de 80s de aire. Los ciclos tienen una duración de 2 min y a la hora se producen un total de 30 ciclos; estos se repiten 8h al día coincidiendo con las horas de sueño de los animales (8:00-16:00h). El resto del tiempo tras la HCI los animales permanecían en sus jaulas en un ambiente normóxico (21% O_2) hasta el día siguiente.

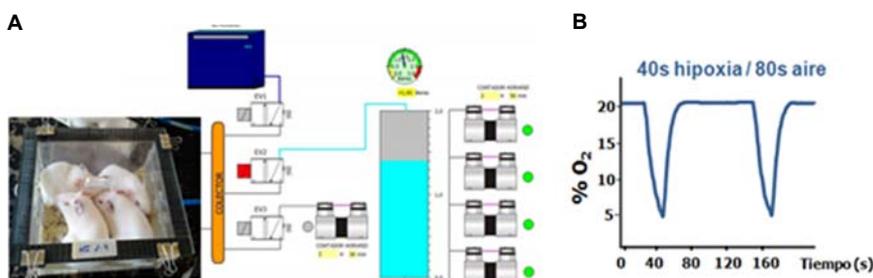


Figura 24. A. Cámara con cuatro cobayas y equipo de exposición a HCI comandado por un autómata. **B.** Representación de los ciclos de HCI (40s hipoxia/80s aire): en el eje Y, el % de O_2 , y en el eje X, el tiempo de exposición en segundos (s).

Hipoxia crónica sostenida (HCS)

La exposición de los cobayas a HCS se realizó en una cámara de cristal (120 x 50 x 52cm) con tapa de metacrilato la cual ajusta herméticamente con la cámara. En la tapa hay varias aberturas utilizadas para suministrar la mezcla de gases y ventilar la cámara de manera continua, impidiendo que la presión aumente en el interior de la misma. En otro orificio se coloca un analizador de O₂ para medir el % de O₂ que se encuentra en el interior de la cámara, permitiendo ajustar los flujos de entrada de aire y nitrógeno para finalmente obtener la mezcla conveniente.

La mezcla de gases deseada en el interior de la cámara se consigue utilizando caudalímetros de precisión. El gas se introduce a través de un tubo de goma por donde confluye el gas proveniente de un conector en Y de otros dos tubos procedentes de las dos balas de gases (aire y N₂). La mezcla de 11% O₂ y resto N₂ se consigue ajustando el flujo de cada bala y será estable dentro de la cámara manteniéndose con un flujo de unos 3L/min.

4.1.1 Procedimientos con animales sin anestésiar

En los animales, cobayas y ratas, de los distintos grupos C e HCl se han realizado los siguientes procedimientos, la mayoría no invasivos:

- Peso corporal a lo largo de la exposición a la HCl para estudiar en cada grupo el efecto de la misma sobre el peso de cada animal.
- Glucemia basal determinada tomando una gota de sangre del animal en estado de ayuno. En la rata la gota de sangre se tomó a través de la cola mediante un pequeño corte en su extremo y en el caso del cobaya, al no tener cola, se realizó una punción con una aguja de jeringa en una vena del talón de la pata trasera del animal. Los niveles de glucemia se obtuvieron mediante un glucómetro (Ascensia Breeze 2; Bayer) junto con las tiras reactivas necesarias.
- Parámetros ventilatorios mediante la realización de pletismografía en todos los grupos al principio y al final de la exposición a HCl. Se midieron los parámetros de frecuencia respiratoria (FR), volumen corriente (VC) y se calculó el volumen minuto (VM) en situaciones de normoxia, diferentes intensidades de hipoxia aguda (12, 10 y 7%O₂, resto N₂), hipercapnia (5%CO₂ en aire) y en condiciones de hiperoxia (100%O₂) para el estudio del test de Dejours realizado en cobayas.

4.1.2 Procedimientos quirúrgicos con animales anestesiados

Por motivos de incompatibilidad en la realización de algunas determinaciones en los mismos animales, por ejemplo, la medida de CA en sangre y en otros tejidos o el estudio de la función de los CC pueden estar condicionados por las maniobras realizadas para la medida de la presión arterial sistémica, los grupos control y experimental de cobayas y ratas, 3M y 20M, se dividieron en subgrupos con el fin de realizar los siguientes procedimientos de manera independiente:

- Gasometría y pH en sangre en distintos puntos del ciclo de HCl
- Medida de parámetros en diversos tejidos *in vitro* y medida de CA en plasma y en otros tejidos
- Medida de PAS
- Medida de presión arterial pulmonar (PAP)

Los experimentos se diseñaron para trabajar con un número limitado de animales, entre cuatro y seis, para que no hubiera interferencias entre los procedimientos. Para ello, el inicio de la exposición a HCl y de los experimentos se hicieron de forma escalonada y progresiva, al igual que en los animales controles para hacer los datos comparables entre los distintos grupos.

Una vez finalizada la exposición a la HCl se realizaron las cirugías en los animales mantenidos en ayunas durante la noche anterior. En primer lugar, se procedió a la anestesia del animal en función de su peso corporal. Los subgrupos de animales de los grupos control y experimental seleccionados para la medida de PAS y para la gasometría y pH en sangre arterial en el ciclo de HCl, se anestesiaron con ketamina (50mg/kg; Merial Laboratorios) y diazepam (1.7mL/kg; Roche) vía intraperitoneal (i.p.). Para el resto de los procedimientos, los animales se anestesiaron con pentobarbital (60mg/kg; i.p.; Lab. Véntoquinol).

La sangre se obtuvo mediante un catéter en la aorta abdominal tras practicar una incisión amplia en el abdomen en los animales anestesiados. Se utilizó como anticoagulante el EDTA-K2 (Venosafe), salvo para la determinación de las CA plasmáticas que se trató con citrato sódico (85mM) en una proporción de 1mL de citrato por 5mL de sangre.

A continuación, se realizó una traqueotomía y se les extrajeron las bifurcaciones de las arterias carótidas y mediante una cámara de lucita provista con solución Tyrode (NaCl 140mM, KCl 5mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, glucosa 5mM y Hepes 10mM; pH

7.40) equilibrada con 100% O₂ se disecaron a 4°C. Mediante iluminación fría y bajo un microscopio de disección (Olimpus) se eliminó el tejido que rodea al CC. Dependiendo de un uso posterior, los CC disecados se mantuvieron de forma diferente. Para la medida del contenido endógeno de CA se colocaron individualmente en tubos *ependorf* con 80µl de ácido perclórico (PCA) 0.1N y 0.1mM EDTA y después, se procesaron para su análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ED). Para la síntesis o liberación de CA se transfirieron a viales de vidrio con Tyrode a 4°C hasta comenzar el experimento. De la misma manera se trató a los diferentes tejidos: ganglio cervical superior (GCS), MA y arteria renal (AR). Una vez disecados, eliminando el tejido circundante, los tejidos se transfirieron a tubos *ependorf* con 200µL de PCA 0.1N y 0.1mM EDTA para medir contenido endógeno de CA por HPLC-ED o se recolectaron en un vial de vidrio manteniéndolos en Tyrode a 4°C para la medida de síntesis o liberación de CA.

Al finalizar los procedimientos se administró una sobredosis de pentobarbital sódico (200mg/kg) para la eutanasia de los animales.

4.2 Medida de parámetros respiratorios

4.2.1 Gasometría y pH en sangre arterial durante el ciclo de HCl

Se seleccionaron ratas, 3M y 20M, C e HCl para valorar las presiones parciales de los distintos gases, la saturación de hemoglobina y el pH sanguíneo durante distintos momentos del ciclo hipóxico del tratamiento de HCl. El animal, una vez anestesiado i.p. con ketamina (50mg/kg) y diazepam (1.7mL/kg), se le colocó un catéter en la arteria carótida por donde se podían extraer pequeñas muestras de sangre. A continuación, se introdujo al animal en la cámara provista del analizador de O₂ con el fin de conocer segundo a segundo el porcentaje de O₂ existente en el interior de la cámara. Por una de las aberturas de la cámara dispuesta para la salida de los gases se deja salir el catéter para facilitar la extracción de sangre. Iniciados los ciclos de HCl se dejó aclimatar al animal durante 30 min (15 ciclos de HI). Transcurrido ese tiempo se tomaron muestras de sangre siguiendo el protocolo que se explica a continuación (**Figura 25A**):

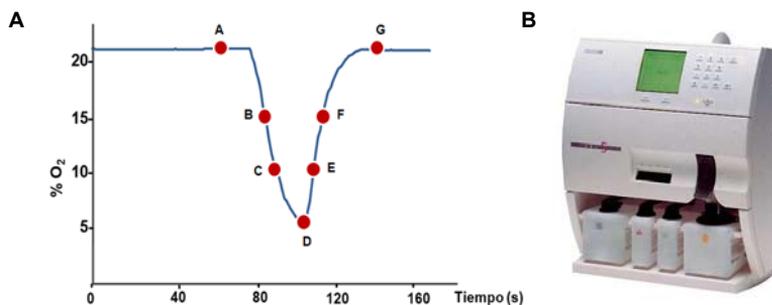


Figura 25. A. Ciclo de HCl y puntos en rojo de la toma de muestra sanguínea a diferentes porcentajes de O₂. A. Aire pre-hipoxia. B. Hipoxia 15%O₂. C. Hipoxia 10%O₂. D. Hipoxia 5%O₂. E. Recuperación 10%O₂. F. Recuperación 15%O₂. G. Aire de recuperación. **B.** Equipo (Radiometer Copenhagen ABL 5) utilizado para el análisis de las muestras sanguíneas a partir de un volumen de 85μL.

Los puntos de toma de muestras de sangre se realizaron en ciclos sucesivos, es decir, cada punto se toma de un ciclo único debido a que la extracción y posterior análisis requieren de un tiempo superior al minuto y un ciclo completo dura un total de 120 s. Las muestras de sangre se analizaron de manera inmediata en el analizador de gases (**Figura 25B**).

4.2.2 Pletismografía

Se seleccionaron animales de cada grupo control y experimental para medir la RVH y la RVHC, en el animal despierto y en libre movimiento mediante la técnica de pletismografía (**Figura 26**). Los experimentos se realizaron en los animales antes y después de la exposición a HCl. Se utilizó un pletismógrafo de cuerpo completo (EMKA, Technologies) que consta de unas cámaras cilíndricas de metacrilato de 5L con flujo continuo, 1L/min para las ratas y 1.5L/min para los cobayas, de una mezcla de gases determinada mediante un caudalímetro (Key Instruments) permitiendo registrar los parámetros ventilatorios en dos animales simultáneamente. Además, la temperatura se monitorizó y se mantuvo en un rango entre 22-26°C. El sistema (Buxco gas Analyzer) debe ser calibrado a diario para ello se inyectó mediante una jeringa un volumen de 5mL de aire en cada cámara, de esta manera el equipo puede estimar el VC. A continuación, el animal se colocó en una de las cámaras durante un periodo de 45 min antes del experimento consiguiendo que se adapte al medio. Cuando el animal estaba en reposo se le sometió al siguiente protocolo experimental (**Tabla 3**):

Protocolo	Flujo (L/min)		Tiempo (min)
	Cobaya	Rata	
Aclimatación 21% O ₂	1,5	1	45
Normoxia 21% O ₂	1,5	1	5
Hipoxia 12% O ₂	4	4	5
	1,5	1	5
Normoxia 21% O ₂	4	4	15
	1,5	1	5
Hipoxia 10% O ₂	4	4	5
	1,5	1	5
Normoxia 21% O ₂	4	4	15
	1,5	1	5
Hipoxia 7% O ₂	4	4	5
	1,5	1	5
Normoxia 21% O ₂	4	4	15
	1,5	1	5
Hipercapnia 5% CO ₂	4	4	5
	1,5	1	5
Normoxia 21% O ₂	4	4	15
	1,5	1	5

Tabla 3. Protocolo experimental de pletismografía para rata y cobaya, antes y después de la exposición a HCl del 5%O₂. Las celdas con sombreado y en negrita, indican los periodos de estimulación que se registran a lo largo del protocolo experimental y las celdas sin sombreado, los periodos necesarios para llegar a la atmósfera de gases estable requerida para obtener un buen registro durante el experimento.



Figura 26. Cámaras y sistema para la monitorización de la respiración en el animal en libre movimiento mediante pletismografía.

Además del protocolo anterior, se realizó en los cobayas, controles y experimentales, el test de Dejours que consistió en aplicar 100%O₂ (10 min) tras condiciones de normoxia, obteniendo los parámetros ventilatorios en condiciones de hiperoxia.

El diseño del protocolo, en cuanto al tiempo de exposición a los distintos estímulos para conseguir la atmósfera adecuada y realizar el registro, es debido al equipo con el que realizamos estos experimentos que permite, además de obtener los parámetros ventilatorios como son FR, VC y VM, un análisis del metabolismo durante el experimento, es decir, obtenemos los datos sobre el consumo de O₂ (VO₂) en respuesta a los estímulos anteriores. El VO₂ se midió utilizando un analizador de gases de CO₂ (BUXCO MAX II). La calibración requirió de un gas de concentración conocida de CO₂ y otro sin CO₂. Todos los parámetros fueron registrados y analizados con el software FinePointe (Buxco Research Systems).

4.3 Medida de la respuesta del cuerpo carotídeo

4.3.1 Estudio morfológico e identificación de CQ

Perfusión de los animales

Cobayas C e HCl se perfundieron por gravedad a través de una columna de 1 metro de altura. Mediante este procedimiento se puede fijar un animal completo introduciendo la solución fijadora en el sistema circulatorio a través del ventrículo izquierdo del corazón. En primer lugar, se introdujo 200mL de buffer fosfato salino (PBS; fosfato 10mM, NaCl 150mM, pH 7.40) a 37°C. A continuación, se procedió introduciendo la solución fijadora, 250mL de paraformaldehído al 4% en un buffer fosfato (PB) 0.1mM a 4°C. Tras la fijación del animal entero se extrajeron las bifurcaciones de las arterias carótidas y los CC limpios de tejido conectivo se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 1 h. Posteriormente, las muestras se crioprotegieron mediante inmersión en un medio de sacarosa al 30% en PB 0.1M y se congelaron embebidas individualmente en Tissue-Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Holanda) a -20°C hasta el momento de realizar los experimentos de inmunohistoquímica y la tinción de hematoxilina y eosina.

Disociación y cultivo celular

Tras la extracción de las bifurcaciones de las arterias carótidas de los cobayas C e HCl previamente anestesiados, se disecaron los CC. Estos libres de tejido conectivo se disociaron enzimáticamente en dos pasos consecutivos:

- Incubación durante 8 min en 2mL de solución Tyrode estéril (0 Ca^{2+} , 0 Mg^{2+}) con 2.5mg/mL de colagenasa tipo IV y 6mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA) a 37°C . Pasado ese tiempo se retiró la solución con el enzima.

- Incubación durante 10 min en 2mL de solución Tyrode estéril (0 Ca^{2+} , 0 Mg^{2+}) con 1mg/mL de tripsina y 6mg/mL de BSA a 37°C .

Posteriormente, se eliminó la solución y se inhibió la actividad enzimática añadiendo 2.5mL de medio DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco; Sigma) suplementado (10% de suero fetal bovino, 1% de penicilina/estreptomicina/fungizona y 2mM de L-Glutamina). Las células se disgregaron mecánicamente con una pipeta Pasteur pulida, se centrifugaron a 1200 rpm durante 3 min y se eliminó el sobrenadante para resuspender el pellet en medio DMEM suplementado.

La siembra se realizó "en gota" (20 μL) en cristales estériles de 15mm de diámetro recubiertos con poli-L-lisina (Sigma) dispuestos en placas de 4 pocillos. Estas se dejaron durante 45min en el incubador (HERA cell 150, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 37°C en un ambiente de 5% CO_2 , 95% aire y una humedad relativa del 95% para su adhesión. Tras ese tiempo, se añadió 1mL de medio DMEM suplementado a 37°C en cada pocillo. Los cultivos celulares, control y experimental, se mantuvieron en el incubador 24 h hasta la realización del experimento de inmunocitoquímica o de la medida de Ca^{2+} citosólico.

Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica

Para el análisis mediante inmunocitoquímica los cultivos celulares se incubaron con el anticuerpo frente a TH. En primer lugar, los cultivos de células de CC se lavaron con PBS, después, durante 10 min a temperatura ambiente se fijaron en paraformaldehído al 4% en PB 100mM. Tras los lavados con PBS se incubaron con solución de permeabilización-bloqueo (PB 10mM, NaCl 0.6M, suero de cabra no inmunizada al 2% y Tritón X-100 0.1%) durante 30 min. Después de los pasos anteriores se procedió a la incubación con los anticuerpos, diluidos en la solución de bloqueo. Se incubó con el anticuerpo primario frente a TH (anticuerpo policlonal anti-tirosina hidroxilasa, dilución 1/500; Abcam) durante toda la noche a 4°C . Una vez realizado el ciclo de lavados con PBS el cultivo celular se incubó con el anticuerpo secundario (cabra anti-conejo) marcado con Alexa 594 (rojo) en condiciones de oscuridad, a temperatura ambiente durante 1 h. Por último, se repitieron los lavados con PBS y se realizó el montaje de los cristales con las células sobre portas con Vectashield H-1000 (Vector Laboratories). Los controles negativos no se incubaron con el anticuerpo primario. Las preparaciones se

observaron con un microscopio confocal (LEICA TCS, SP5) del Servicio de microscopía del IBGM y se procesaron usando el software LAS AF Lite.

Para el estudio de inmunohistoquímica se utilizaron secciones de 10µm de grosor del tejido obtenidas con un criotomo (Shandon Cryotome, Thermo, Electron Corporation) y colocadas en portas de cristal tratados con poli-L-lisina (Sigma). El protocolo que se siguió fue el mismo que para el análisis mediante inmunocitoquímica.

4.3.2 Contenido endógeno y síntesis de catecolaminas

Para estudiar el contenido de CA en el CC de cobayas C e HCl, una vez se tuvieron aislados en tubos *ependorf* con 80µL de PCA 0.1N 0.1mM de EDTA, se homogenizaron en frío con un homogeneizador de tejidos vidrio/vidrio llegando a un volumen final de 120µL. A continuación, se centrifugó el homogeneizado durante 10 min a 16000g y el sobrenadante se recolectó para su congelación a -80°C y posterior determinación mediante HPLC-ED. La manera de identificar y cuantificar las CA fue utilizando estándares de NE, epinefrina (E), ácido dihidroxi-fenil acético (DOPAC) y DA de concentraciones conocidas e inyectados previamente en el HPLC-ED (voltaje 0.65V y sensibilidad 1nA). La fase móvil utilizada fue 25mM Na₂HPO₄, 0.65mM OSS (ácido 1-octanosulfónico sal sódica), 0.1mM EDTA, pH 3.54 y 6% Metanol (MeOH), con flujo de 1mL/min.

El sistema HPLC-ED utilizado está compuesto por las siguientes partes: bomba Waters 600 Controller, inyector automático Waters 717 plus Autosampler, columna de Phenomenex Gemini 5u C18 110A (150x4.60mm), detector electroquímico BAS LC-4C con celda electroquímica CC-5E y tarjeta de adquisición de datos Peak Simple Chromatography Data System SRI Model 202. El registro y análisis de los resultados cromatográficos se realizaron con el programa informático Peak Simple 3.29.

Para estudiar la síntesis de CA en los CC de rata, los CC se incubaron durante 2 h a 37°C en un vial con medio de incubación (**Tabla 4**) formado por:

Medio de incubación	
Solución Tyrode (NaCl 140mM; KCl 5mM; CaCl ₂ 2mM; MgCl ₂ 1.1mM; HEPES 10mM; glucosa 5mM; pH 7.40)	
3,5-³H-tirosina (³H-Tyr) (30μM; Perkin Elmer)	Precursor natural de las CA Actividad específica de 40-50Ci/mmol
DL-metil-tetrahidrobiopterina (0.1mM)	Cofactor de la tirosina hidroxilasa
Ácido ascórbico (1mM)	Cofactor de la dopamina β-hydroxilasa

Tabla 4. Medio de incubación utilizado en los experimentos de síntesis de CA.

Pasado el tiempo de incubación, los CC se lavaron en solución Tyrode libre del precursor y de los cofactores, durante 5 min a 4°C para lavar la ³H-Tyr presente en el medio extracelular. A continuación, los CC se colocaron en un tubo *ependorf* con 80μL de PCA 0.1N EDTA 0.1mM, y se procedió de la misma manera que para el estudio del contenido endógeno de CA, homogenizando el tejido y centrifugando el contenido.

La manera de analizar las CA sintetizadas por el CC, consistió en coleccionar fracciones de 1mL de la muestra inyectada previamente en el HPLC-ED en viales a los que, a continuación, se añadió 4mL de líquido de centelleo (Optiphase "Hisafe" 3, Perkin Elmer) con el fin de medir su marcaje radiactivo en un contador de centelleo (Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR, Perkin Elmer). Para identificar y coleccionar bien cada fracción, es necesario separar las CA en el cromatograma; también se utilizaron estándares de NE, E, DOPAC y DA de concentraciones conocidas y las siguientes condiciones cromatográficas: fase móvil 25mM Na₂HPO₄, 0.65mM OSS, 0.1mM EDTA, pH 3.08 y 5% MeOH; Voltaje 0.85V y sensibilidad 1nA; flujo de 1mL/min.

4.3.3 Secreción de catecolaminas

Para estudiar la respuesta de los CC *in vitro* ante distintos estímulos, se midió la secreción de CA marcadas isotópicamente con ³H-Tyr, como ya se ha mencionado, el precursor natural de su síntesis. En primer lugar, se procedió con la incubación de los CC, libres de tejido conectivo, en un vial con medio de incubación (**Tabla 4**) a 37°C durante 2 h. Tras la incubación con ³H-Tyr, los CC se transfirieron individualmente a viales de vidrio con solución Tyrode bicarbonato (NaCl 116mM, KCl 5mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, NaHCO₃ 24mM, Hepes 10mM y glucosa 5mM). A continuación, se realizaron una serie de lavados durante 1 h renovándose la solución Tyrode bicarbonato

cada 20 min para eliminar restos de la $^3\text{H-Tyr}$. Además, se mantuvieron en agitación, a 37°C y gaseados con una mezcla de gases control ($20\%\text{O}_2$, $5\%\text{CO}_2$, resto N_2) ajustándose el pH a 7.40. Tras la hora de los lavados comenzó el experimento. Los CC se gasearon siempre con la mezcla de gases control, salvo cuando el estímulo fue la hipoxia. Cada 10 min se tomó las soluciones de superfusión y se repuso el volumen retirado con solución Tyrode bicarbonato. Las soluciones recogidas se acidificaron añadiendo ácido acético glacial y ácido ascórbico, a pH 3.20, evitando así la degradación de las CA. Por último, las soluciones se mantuvieron a 4°C hasta su análisis en un contador de centelleo.

El protocolo de secreción de CA en CC (**Figura 27**) se compone de dos ciclos: S1 y S2. Antes de realizar el primer ciclo del protocolo se recolectaron dos soluciones control (Tyrode bicarbonato equilibrado con gaseo control: $20\%\text{O}_2$, $5\%\text{CO}_2$, resto N_2) cada una correspondiente a 10 min de incubación. El primer estímulo, S1, consistió en incubar los CC en un medio hipóxico (Tyrode bicarbonato gaseado con una mezcla de gas hipóxico: $2\%\text{O}_2$, $5\%\text{CO}_2$, resto N_2), y el segundo, S2, en un medio rico en K^+ (NaCl 61mM, KCl 60mM, CaCl_2 2mM, MgCl_2 1mM, NaHCO_3 24mM, HEPES 10mM y glucosa 5mM) manteniendo la osmolaridad constante al reemplazar las cantidades equimolares de Na^+ por K^+ . Tras los estímulos de 10 min cada uno, se generaron 4 periodos de incubación del mismo tiempo llamados post-estímulos.



Figura 27. Protocolo de medida de secreción de CA marcadas isotópicamente ($^3\text{H-CA}$) en situaciones control, de hipoxia (S1) y alto K^+ (S2), en CC de animales controles y experimentales tras la exposición a HCl (C = situación control y PS = post-estímulo).

El procedimiento para el análisis de las $^3\text{H-CA}$ que contienen las soluciones recolectadas, se basó en la absorción de las CA por la alúmina ácida a pH alcalino y posterior elución a pH ácido²⁷⁵. Para ello, se añadió alúmina ácida (100mg, BioRad) a las soluciones y se alcalinizó con 4mL de buffer Tris-HCl 2M pH 8.70. Posteriormente, las CA fueron eluidas con 1mL de HCl 1N y se añadió líquido de centelleo (Optiphase "Hisafe" 3, perkin Elmer) para introducir las en un contador de centelleo (Liquid Scintillation Analyzer Tri-Carb 2800TR, Perkin Elmer).

Por otro lado, los CC utilizados en el experimento se homogeneizaron en un homogeneizador vidrio/vidrio con PCA 0.4N a 4°C . Se centrifugaron a $14000g$ 5 min a

4°C y se recolectó el sobrenadante para estudiar las CA residuales de la misma manera que las soluciones recolectadas en el propio experimento de liberación.

4.3.4 Medida de Ca^{2+} citosólico en CQ con Fura-2AM

Para la medida de Ca^{2+} citosólico en las células disociadas de CC se utilizó: un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-S (Nikon Corporation, Tokio, Japón) con un objetivo S-flúor 40x de inmersión en aceite, adecuado para fluorescencia y un conjunto de espejos dicróicos para el uso del fluoróforo utilizado Fura 2-AM, un sistema de iluminación compuesto por una lámpara de xenón acoplada a un monocromador (Cairn Research Ltd, UK) y sistema de detección formado por una cámara CCD-EM modelo C9100-02 (Hamamatsu Photonics KK, Joco-Cho, Japón). Para el registro de los experimentos de Ca^{2+} se utilizó el programa MetaFluor (Molecular Devices Corporation, Downingtown, PA, USA) y el análisis *off-line* se realizó con Origin 7 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) y GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

Utilizamos el fluoróforo Fura-2 en su forma acetoximetiléster (AM) para los experimentos de medida de Ca^{2+} . De esta forma el Fura-2-AM puede penetrar libremente a través de la membrana celular y ser atacado por esterasas citosólicas inespecíficas que hidrolizan el grupo acetoximetiléster, convirtiéndolo en su forma iónica, sensible a Ca^{2+} , fluorescente e impidiendo que salga del interior celular.

Para la medida del Ca^{2+} citosólico en las células quimiorreceptoras de CC de rata y cobaya, controles y experimentales, los cultivos celulares fueron incubados con Fura-2-AM (2 μM ; Molecular Probes) diluido en Tyrode, a temperatura ambiente durante 45 min y en agitación continua (agitador PSU-2T plus, Boeco, Hamburgo, Alemania). Tras un periodo de lavado con Tyrode para eliminar el fluoróforo no incorporado en las células, el cristal con el cultivo celular se dispuso en la cámara de perfusión acoplada en la platina del microscopio invertido. A continuación, se perfundió con una solución Tyrode/bicarbonato (NaCl 116mM, KCl 5mM, CaCl_2 2mM, MgCl_2 1mM, NaHCO_3 24mM, Hepes 10mM y glucosa 5mM) gaseado con 20% O_2 , 5% CO_2 y resto N_2 equilibrada a pH 7.40 a 37°C y a un flujo de 3mL/min. Para el cambio de soluciones en la cámara existen unos canales provistos de una electroválvula que permite el cambio instantáneo de una solución a otra. La temperatura de las soluciones se mantuvo a 37°C gracias a un baño con un sistema de calentamiento en línea (modelo SF28, Warner Instruments Corporation, Handem, CT, USA) y un controlador automático de temperatura (modelo TC-344B, Warner Instruments Corporation, Handem, CT, USA).

En los experimentos de medida de Ca^{2+}_c las células dissociadas de CC fueron estimuladas mediante el uso de diferentes soluciones:

- Estímulo hipóxico: Tyrode bicarbonato gaseado con 95% N_2 y 5% CO_2
- Estímulo despolarizante: Tyrode bicarbonato con 35mM de K^+ gaseado con 20% O_2 , 5% CO_2 y resto N_2

El Fura-2 es un fluoróforo radiométrico de excitación dual, es decir, se excita a dos longitudes de onda (340nm y 380nm) y emite en una única longitud de onda (510nm). Se obtuvieron imágenes para cada longitud de onda cada dos segundos y el tiempo de exposición fue de 100ms. Mediante el programa de análisis se eliminó el *background* y las medidas de Ca^{2+}_c citosólico de los experimentos se presentaron como el *ratio* entre la fluorescencia emitida a 340nm y la fluorescencia emitida a 380nm (F340/F380). Finalmente, se realizó una integral acumulativa (running integral) del *ratio* de la fluorescencia con el objetivo de obtener la respuesta media del estímulo.

4.4 Parámetros relacionados con la actividad simpática

4.4.1 Contenido de catecolaminas en plasma

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante un catéter en la arteria aorta abdominal tras practicar una incisión amplia en el abdomen en los animales previamente anestesiados. De este modo, se obtuvo solo sangre arterial debido a que los niveles de CA varían en función de si la sangre es arterial o venosa²⁷⁶. La sangre se dispuso en tubos con el anticoagulante citrato en una proporción: 1mL de citrato sódico por 5mL de sangre. Se centrifugó a 1000g a temperatura ambiente durante 5min. Se recogió el sobrenadante en tubos *ependorf* y se congeló a -80°C hasta su análisis en HPLC-ED.

Para el análisis de las CA plasmáticas, las muestras de plasma deben de ser tratadas previo a la inyección en el sistema HPLC-ED. Para ello, se utilizaron unos cartuchos de la marca Waters (Oasis-HLB de 1mL), los cuales poseen un lecho de fase inversa polimérica universal (30mg) donde quedan retenidas las aminas. Una vez acondicionados los cartuchos se pasó por ellos la muestra de plasma, y finalmente, se eluyó con ácido cítrico 26.7mM a pH 2.90 y 2.5% MeOH consiguiendo una recuperación del 98%²⁷⁷. Por último, se inyectó en el sistema de HPLC-ED para cuantificar los niveles de CA en el plasma, utilizando estándares externos intercalados con las muestras para su calibración. La fase móvil utilizada fue: 25mM Na_2HPO_4 , 0.65mM OSS, 0.1mM EDTA, pH 3.54 y 6% MeOH; voltaje 0.65V, sensibilidad 1nA; flujo de 1mL/min.

4.4.2 Contenido y síntesis de catecolaminas en otros tejidos

La medida del contenido endógeno de CA en GCS, MA y AR, se realizó mediante HPLC-ED al igual que se hizo para el CC. Los tejidos, previamente pesados en una electrobalanza (Supermicro, Sartorius, Pacisa, Madrid), se homogeneizaron en PCA 0.1N EDTA 0.1mM y el sobrenadante tras la centrifugación se utilizó directamente para inyectar en el HPLC-ED. Para identificar y cuantificar las CA se utilizaron: estándares de NE, E, DOPAC y DA de concentraciones conocidas inyectados previamente en el sistema HPLC-ED y las siguientes condiciones cromatográficas: fase móvil 25mM Na₂HPO₄, 0.65mM OSS, 0.1mM EDTA, pH 3.54 y 6% MeOH; voltaje 0.65V; sensibilidad 1nA; flujo de 1mL/min.

De la misma manera que se ha descrito para el estudio de la síntesis de CA en CC, en los tejidos de AR, se procedió con la incubación durante 2 h a 37°C en un vial con medio de incubación (**Tabla 4**). En este caso la actividad específica de la ³H-Tyr fue de 6Ci/mmol. Pasado el tiempo de la incubación, el tejido se lavó en Tyrode durante 5 min a 4°C para eliminar la ³H-Tyr presente en el medio extracelular. A continuación, se pusieron los tejidos de manera individual en un tubo *ependorf* con 200µL de PCA 0.1N EDTA 0.1mM y se continuó de la misma manera que para el estudio del contenido de CA, homogenizando el tejido y centrifugando el contenido. El sistema para el estudio de la síntesis de CA fue el mismo que el utilizado en la síntesis de CA en CC.

4.4.3 Secreción de catecolaminas por la médula adrenal

Para determinar una posible sensibilidad a la hipoxia por parte de las células cromafines de la MA de cobaya, se estudió la secreción de CA por la MA ante un estímulo hipóxico y un estímulo despolarizante. Debido a la cantidad de CA presentes en MA no fue necesario marcar isotópicamente los depósitos.

Se comenzó el experimento colocando individualmente las MA de los cobayas, C e HCl, en viales de vidrio con solución Tyrode bicarbonato, en agitación, a 37°C y con gaseo control (20% O₂, 5% CO₂, resto N₂) ajustando el pH a 7.40. Tras un lavado de 30min se comenzó a recolectar los efluentes. Las MA se mantuvieron con el mismo gaseo control, menos cuando el estímulo fue la hipoxia. Cada 10 min se tomó la solución de superfusión y se repuso con Tyrode bicarbonato para finalmente analizarlo por HPLC.

El protocolo de secreción de CA por la MA (**Figura 28**) consistió en dos ciclos: S1 y S2. Antes del primero se colectó una fracción control de medio de incubación equilibrado con 20% O₂, 5% CO₂, resto N₂. El primer estímulo, S1, se compone de un medio de

incubación hipóxica (2% O₂), y el segundo, S2, de un medio rico en K⁺ (60mM) durante 10 min cada uno. Cada estímulo fue seguido de 2 periodos de incubación de 10 min, llamados post-estímulos con medio equilibrado con gaseo control. Para terminar, a cada solución se le añadió PCA 0.4N para su análisis por HPLC-ED. Para identificar y cuantificar las CA de cada solución se utilizaron estándares externos inyectados en el HPLC-ED para su calibración. La fase móvil utilizada fue: 25mM Na₂HPO₄, 0.65mM OSS, 0.1mM EDTA, pH 3.35 y 4% MeOH; voltaje 0.65V y sensibilidad 1nA; flujo de 1mL/min.



Figura 28: Protocolo de medida de secreción de CA por la MA en situación: control, hipoxia (S1) y alto K⁺ (S2), en MA de cobayas, controles y tras la exposición de HCl (C = situación control y PS = post-estímulo).

4.5 Medida de la presión arterial sistémica

Tras la exposición a la HCl el animal fue anestesiado y se le colocó sobre una manta térmica con termostato (RTC1 Cibertec) y un termómetro rectal para mantener constante la temperatura durante el experimento. A continuación, se le practicó una traqueotomía colocando una cánula, a través de la cual se le ventilaba aire ambiente con un respirador (Harvard Rodent Ventilator Model 683) a una frecuencia de 60 ventilaciones/min y una presión espiratoria positiva de 2cm de H₂O. El volumen corriente se determinó en función del peso del animal, aproximadamente 2.4mL para un animal de 300g. Se dejó al animal conectado al respirador durante 5 min para su estabilización y a continuación, se tomó una muestra sanguínea a través de la arteria carótida canulada para comprobar si el animal estaba bien ventilado, mediante los valores de PCO₂ y PO₂ obtenidos en el analizador de gases (Radiometer Copenhagen ABL5).

Los valores de la FC y de la PAS se obtuvieron por medio de un catéter (SELDICATH 3F 8cm x 1mm, plastimed PRODIMED) colocado en la arteria carótida común, el cual, estaba conectado a un transductor de presión (Transpac IV, ICU Medical, Inc. San Clemente, CA 92673 USA). Registrados los valores basales de FR y PAS se estudió la respuesta a un test de hipoxia. Para ello, el animal fue ventilado con una mezcla hipóxica (10% O₂) durante 3 min, tiempo suficiente para que la presión fuera estable en esta condición. En este punto se tomó una muestra de sangre para hacer una gasometría y ver los cambios producidos por el test de estimulación hipóxica en los gases de los

animales controles y experimentales. Al cabo de los 3 min en hipoxia se ventiló al animal de nuevo con aire para que recuperara su estado basal continuando con el registro hasta que se estabilizó.

Para el estudio del efecto agudo de la domperidona (2.5mg/kg; Sigma) sobre la PAS, el fármaco fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO; 0.1%) e inyectado i.p. en el animal. Los nuevos valores de PAS se tomaron 20min después de su aplicación, tiempo suficiente para ver el efecto de la domperidona. Otros animales, controles y experimentales, se utilizaron para comprobar que la sustancia en la que va disuelta el fármaco no causaba efecto en la PAS por sí misma. Para ello, se inyectó i.p. un volumen de DMSO 0.1% determinado en función del peso, como si se tratara del volumen necesario para la concentración dada del fármaco, mientras se monitorizaba la PAS del animal en estudio.

Se utilizó el sistema BIOPAC MP150 para detectar la señal, una tarjeta de adquisición de datos (Power Lab 16SP ADI Instruments, Castle Hill, Australia) para transformar la señal analógica en digital y el programa Chart4 para el análisis de los registros de la FC y de la PAS.

4.6 Medida de la presión arterial pulmonar

Para registrar la PAP se realizó una toracotomía con una abertura de tamaño suficiente para visualizar el corazón. Localizado el ventrículo derecho se introdujo en él un catéter de grosor 22Gx1" (NIPRO AFELET CATH) atravesando su pared y avanzando hasta la arteria pulmonar. La cánula se conectó a un transductor de presión y la señal fue detectada por el sistema BIOPAC MP150, a su vez conectado a una tarjeta de adquisición de datos, permitiendo la monitorización del registro a través del ordenador.

El animal fue ventilado mecánicamente con una mezcla de gas normóxica hasta conseguir un registro de PAP estable. A continuación, se estudió la VPH empleando una mezcla de gas hipóxico del 10% de O₂ durante 3 min. Transcurrido ese tiempo, se le administró de nuevo una mezcla de gas normóxica hasta restablecer los valores de PAP.

4.7 Medida del Índice de Fulton

El índice de Fulton indica el nivel de hipertrofia que puede presentar el ventrículo derecho (VD) relacionándolo con el resto del corazón. Para su determinación se diseccionó el corazón, se retiraron las aurículas y se midió el peso en gramos del VD por un lado y del septum (S) junto al ventrículo izquierdo (VI) por otro. El cálculo del índice de Fulton se realizó según la relación: $VD / (VI+S)$.

4.8 Medida de la respuesta vascular: Miografía

Para estudiar la respuesta vascular se utilizó la metodología descrita por Mulvany y Halpern²⁷⁸. Las arterias carótidas y pulmonares limpias, se cortaron en anillos de 2mm de longitud y se montaron en los baños, con solución Krebs (NaCl 118.5mM, KCl 4.7mM, MgSO₄ 7H₂O 1.2mM, KH₂PO₄ 1.2mM, NaHCO₃ 25mM, CaCl₂ 2,5mM, Glucosa 5.5mM, pH 7.40) a 4°C, de un miógrafo multicanal (610M, Danish Myotecnology) (**Figura 29A**) permitiendo el estudio de 4 arterias simultáneamente.

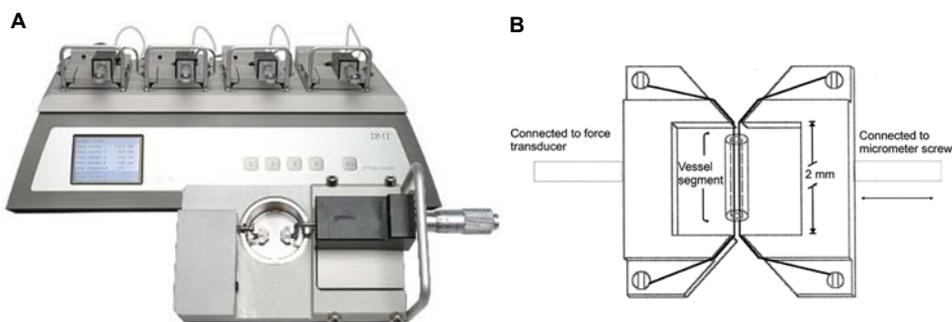


Figura 29. A. Miógrafo de alambre de cuatro canales. B. Imagen del montaje de la arteria en un cabezal de un miógrafo.

A continuación, con la ayuda de un microscopio (Olimpus), se introdujo por el interior de la arteria un alambre de 40µm y se fijó con tornillos a un cabezal unido a un tornillo micrométrico; otro alambre se aseguró con tornillos a otro cabezal unido a un transductor de fuerza (**Figura 29B**), este envía la información al ordenador donde se procesa a través del programa de adquisición de datos (Power Lab 16SP ADInstruments, Castle Hill, Australia).

Montados los anillos arteriales se dejaron estabilizar a 37°C durante 30 min gaseados con una mezcla compuesta de 21%O₂, 5%CO₂ y resto N₂. Después, se procedió a la

normalización del vaso (0mN) y posteriormente las arterias se estiraron hasta una circunferencia interna a la cual la fuerza desarrollada es máxima en ellas, que suele ser de 3-4mN en la arteria pulmonar y 7-8mN en la carótida. Una vez estiradas hasta el nivel indicado, se comprobó la viabilidad de las arterias mediante la exposición a una solución de Krebs enriquecida en K⁺ (80mM) un total de tres veces. La última exposición a K⁺ sirvió para estandarizar la respuesta al uso de los vasoconstrictores y vasodilatadores (representada como porcentaje de la respuesta máxima a K⁺). Tras lavar las preparaciones, los anillos de las arterias estaban listos para ser expuestos a los diferentes estímulos.

Se midió la propiedad contráctil de las arterias administrando un vasoconstrictor, la fenilefrina (PE; Sigma), y la capacidad de relajación del endotelio con carbacol (Sigma), agonista muscarínico, el cual estimula la secreción de NO. Para la determinación de la respuesta a PE y a carbacol, se realizaron curvas dosis-respuesta con concentraciones crecientes: desde 0.01 a 3μM de PE en ratas, desde 0.1 a 30μM de PE en cobayas y de 0.001 a 10μM de carbacol en las arterias de ambos animales. En cada caso se determinó la respuesta a cada concentración una vez que ésta alcanzó un valor estable. Finalmente, para determinar el efecto del NO en las arterias de interés, se realizó bloqueo con L-NAME, NG-nitro-L-arginina metiléster (Santa Cruz Biotechnology), un inhibidor competitivo de la NOS. Estos experimentos se llevaron a cabo realizando las curvas dosis-respuesta de PE y carbacol, a continuación, se añadió al medio L-NAME 100μM para repetir de nuevo, tras 30 min de incubación con el inhibidor, las curvas de PE y carbacol. De este modo se analizó la repercusión del NO en las propiedades contráctiles y relajantes en las arterias, controles y experimentales, sistémicas y pulmonares.

4.9 Estudio morfológico vascular: Tinción tricrómico de Masson

El estudio morfológico de las arterias se realizó a través de la tinción tricrómica de Masson. Las muestras de arteria fueron fijadas embebidas en paraformaldehído (10%) durante 24h y a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron y se conservaron en PBS a 4°C hasta su procesamiento por el Servicio de Histología del CNB-CSIC (Madrid). Las secciones se examinaron con un microscopio (Olympus BX41). Las imágenes fueron capturadas usando una cámara digital (Olympus DP20) acoplada al microscopio y se analizaron utilizando el software Cell^A.

4.10 Determinaciones plasmáticas

4.10.1 Determinación de nitritos

La naturaleza volátil y la escasa vida media del NO hacen que esta molécula sea difícilmente cuantificable. Sin embargo, el hecho de que la mayoría del NO sea oxidado a nitritos (NO_2^-) y nitratos (NO_3^-) (**Figura 30A**), permite la cuantificación de la producción de NO a partir de estos sin problema. Se midieron los niveles plasmáticos de nitrato más nitrito de acuerdo con el procedimiento descrito por Moshage²⁷⁹. Se trata de un método colorimétrico basado en la reacción del nitrito con el reactivo de Griess. Para ello, hay una transformación enzimática previa del nitrato en nitrito (**Figura 30B**) mediante la nitrato reductasa de *Aspergillus niger* (6.03×10^{-3} u/ μL ; Sigma) y el cofactor NADPH (Nicotinamín-adenin-dinucleótido fosfato (forma reducida) $550 \mu\text{M}$; Sigma).

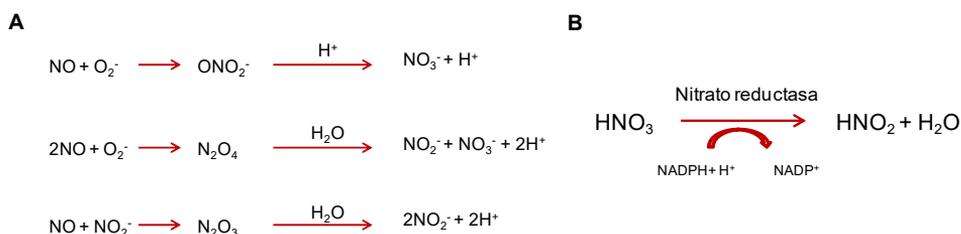


Figura 30. A. Conversión del NO en nitratos y nitritos. **B.** Reacción de reducción enzimática de nitratos a nitritos.

Para esta determinación se usaron placas de 96 pocillos en las que se distribuyeron las muestras de plasma ($50 \mu\text{L}$) procedente de las ratas y cobayas, controles y experimentales, junto con la curva estándar. Los nitritos de la muestra y el reactivo de Griess (naftiletilendiamina 0.2% y ácido sulfanílico 2% en medio ácido; Sigma) interaccionan generando un cromóforo rosado que absorbe a una longitud de onda de 540nm . La concentración de nitratos en las muestras procesadas se valoró en función de la intensidad de color rosado, medido mediante un lector de placas a 540nm , comparándolo con la curva patrón construida con cantidades conocidas de nitrato.

4.10.2 Determinación de L-arginina y sus metabolitos

Para determinar la concentración de L-arginina y sus metabolitos metilados en plasma de cobayas y ratas, se ha utilizado la técnica de HPLC con un detector de fluorescencia tal como describió Teerlink²⁸⁰. En primer lugar, se prepararon las muestras de plasma ($200 \mu\text{L}$) añadiendo a estas el estándar interno MMA ($4 \mu\text{M}$; Sigma-Aldrich) y

diluyéndolas en PBS hasta un volumen final de 1mL. Para la determinación es necesario acondicionar la muestra mediante el uso de cartuchos (Waters Oasis MCX 1cc, 30mg) a través de los cuales se realizó una extracción en fase sólida en columna utilizando un sistema de vacío. Se procedió al pre-acondicionamiento de los cartuchos por las cuales se pasó una solución eluyente con la siguiente composición: amonio, NaOH, H₂O y MeOH (10/0.5/39.5/50) y un lavado con H₂O desionizada. A continuación, se añadió la muestra preparada en PBS, se realizó un lavado con HCl 100mM seguido de otro lavado con MeOH y, para terminar, se eluyeron las muestras con la misma solución eluyente recogiénolo en tubos *ependorfs* y conservándolo a -20°C hasta el momento del análisis.

Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales (LTI) de la Universidad de Valladolid. Las muestras se secaron con corriente de N₂ y se resuspendieron en HCl 0.01N. La identificación y cuantificación del aminoácido L-arginina y sus metabolitos se realizó mediante la técnica de HPLC-FD y la derivatización precolumna con orto-ftalaldehído (OPA). Para ello, se inyectó en el sistema una mezcla de estándares (L-Arginina, ADMA, SDMA, MMA; Sigma-Aldrich) de concentración conocida para su calibración. Se utilizó una columna ZORBAX Eclipse AAA 4.6mm x 150mm x 3.5µm, un detector FLD Ex/Em (nm) 340/455 y los siguientes parámetros cromatográficos: eluyente A: 40mM NaH₂PO₄ a pH 7.80; eluyente B: ACN/MeOH/H₂O (45/45/10); flujo: 2mL/min. El inyector se programó para realizar la derivatización con OPA de 1µl de muestra.

4.10.3 Determinación de angiotensina II, endotelina-1, factor de crecimiento endotelial vascular, péptido natriurético atrial y eritropoyetina.

Angiotensin II ELISA kit (Enzo) es el kit que se utilizó para la determinación cuantitativa de All en plasma de ratas y cobayas, controles e HCl. Antes de comenzar el ensayo, fue necesario un pre-tratamiento de la muestra como indican las instrucciones del método. Para ello, se utilizaron columnas Sep-Pak C18 (Waters) previamente acondicionadas con 0.5 mL MeOH y 1mL 1% TFA (ácido trifluoroacético) (x3). Por otro lado, en un tubo de centrifuga se añadió 500µL de muestra a 500µL de 1% TFA y se centrifugó a máxima velocidad, a 4°C, durante 20min. El sobrenadante se cargó en los cartuchos pre-acondicionados y se lavó 1mL de TFA 1% (x2). Finalmente, se eluyó con 1mL de ACN (acetonitrilo) 60% y TFA 1% mediante rotación lenta (300-500rpm) y se liofilizó. Previamente a la realización del ELISA las muestras se reconstituyeron con tampón de ensayo disponible en Kit.

Los pocillos de la microplaca, recubiertos con un anticuerpo IgG anti-AII, se incubaron con la muestra o con el estándar (100 μ L). A continuación, se añadió un anticuerpo para AII conjugado con biotina uniéndose a la AII inmobilizada. El exceso de conjugado se eliminó tras el lavado. Después, se añadió a los pocillos la peroxidasa de rábano picante (HRP) conjugada a estreptavidina uniéndose al complejo de anticuerpo biotinilado. Por último, se añadió el substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina) que se oxidó tras la reacción enzimática para formar un complejo azulado. La reacción se paró añadiendo el ácido, el cual produce un cambio en el color de azul a amarillo (**Figura 31**). La cantidad de color generada es directamente proporcional a la cantidad de conjugado unido al complejo anticuerpo AII, el cual, a su vez, es directamente proporcional a la cantidad de AII en la muestra o en el estándar. Se midió la absorbancia de este complejo mediante un lector de placas (Heales, China) a 450nm. La concentración de AII de cada muestra se determinó comparando los valores de la absorbancia de la misma a partir de la curva estándar realizada.

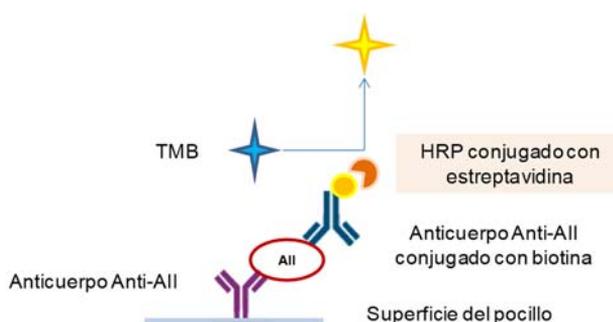


Figura 31. Imagen de la detección de Angiotensina II usando la técnica ELISA.

También se utilizó la técnica de inmunoensayo ELISA, como se ha descrito anteriormente, para determinar los niveles de endotelina-1, péptido natriurético atrial, VEGF y eritropoyetina (todos ellos de MyBioSource) en plasma de los cobayas, controles y experimentales.

4.11 Medida del estrés oxidativo mitocondrial: Aconitasa/Fumarasa

Para la valoración la actividad enzimática de la aconitasa y de la fumarasa en hígado se siguió el método descrito por Couplan²⁸¹. Al tejido hepático fresco de los cobayas se le añadió un volumen de buffer de lisis (10mM Tris-HCl, pH 7.40, 250mM sacarosa, 1mM EDTA) 10 veces el peso del tejido. A continuación, se homogeneizaron con un

homogeneizador OMNI-MIXER para aislar las mitocondrias por el método descrito por Pecqueur²⁸². El pellet mitocondrial obtenido se resuspendió en el buffer de lisis y junto a Tritón X-100 se lisaron las mitocondrias a una concentración final de 0.5% peso/volumen.

Para la determinación de proteínas en las muestras se siguió el método de Bradford²⁸³. Se basa en la formación de un complejo entre las proteínas de la muestra y el reactivo bradford comercial (Brilliant Blue G, SIGMA). Se midió la absorbancia a 595nm del complejo formado por las proteínas de la muestra y el reactivo Bradford (1 parte de muestra con 30 partes de reactivo). Para cada medición se hizo un blanco y también se realizó una curva patrón, utilizando BSA (albúmina de suero bovino) como estándar, de concentración lineal de 0.1 a 1.4mg/mL de proteína, determinándose la concentración de proteínas por interpolación en la misma.

Para realizar el ensayo enzimático se necesitaron alícuotas de los lisados mitocondriales junto al medio adecuado en función del enzima. Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo durante 8 min en 30mM isocitrato sódico, 50mM Tris-HCl, pH 7.40, 0.6mM MnCl₂ para la aconitasa y 50mM L-malato sódico, 50mM Na₂HPO₄, pH 7.40 para la fumarasa. El cociente de la actividad Aconitasa/Fumarasa (A/F) se expresó en función de los incrementos lineales de densidad óptica a 240nm en ambas enzimas por min y por mg de proteína. El equipo utilizado para medir las absorbancias fue el Hitachi U2800 Spectrophotometer.

4.12 Medida del nivel de inflamación: Factor nuclear kappa B

Para identificar y cuantificar el factor NF-kB activado en cobayas se utilizó el kit p65 TransAM transcription factor assay kit (40096; Active Motif). Se basa en valorar la unión específica NF-kB al ADN a través de la detección de la subunidad p65 del NF-kB.

En primer lugar, se realizó la extracción de los núcleos celulares de las muestras de tejido hepático de las cobayas tal y como aparece en el Kit de extracción nuclear (Nuclear Extract kit 40010; Active Motif, Rixensart, Belgium). Para ello, se homogeneizó el tejido en 3mL de buffer hipotónico con 3µL de Dithiothreitol (DTT) y 3µL de detergente (SDS) por gramo de tejido, se incubó en hielo 15 min y se centrifugó varias veces a 4°C (10min. 850g; 30s 14000g; 10min. 14000g) desechando el sobrenadante. A continuación, se midió el contenido de proteínas del pellet obtenido mediante el método de Bradford como ya se ha mencionado en el apartado anterior.

Los pocillos de la microplaca recubiertos con oligonucleótidos específicos para el NF-kB activado se incubaron con el extracto nuclear de las muestras (20µL). Tras eliminar el

exceso de muestra o de estándar, los pocillos se incubaron con un anticuerpo anti-NF- κ B uniéndose al NF- κ B activado al reconocer específicamente un epítipo de la proteína p65. El exceso de anticuerpo primario se eliminó tras el lavado. A continuación, se añadió a los pocillos el anticuerpo secundario, un anticuerpo IgG conjugado con HRP (anti-conejo). Por último, se añadió el sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametil-benzidina) el cual se oxidó tras la reacción enzimática para formar un complejo azulado. La reacción se paró añadiendo el ácido, el cual produce un cambio en el color de azul a amarillo (**Figura 32**). La detección del complejo de anticuerpos se realizó por espectrofotometría midiendo la absorbancia de las muestras a 450nm. Los datos se expresaron como veces respecto al control.

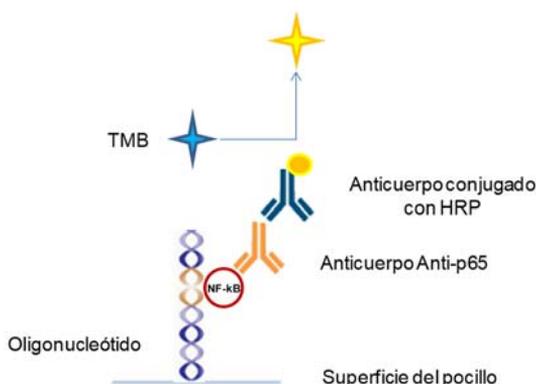


Figura 32. Imagen de la detección de la activación del NF- κ B en extracto nuclear.

4.13 Análisis de datos

Los datos se analizaron utilizando el programa estadístico Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA) y los valores obtenidos son expresados como la media \pm error estándar de la media (media \pm SEM). Las diferencias significativas entre las medias se han determinado mediante t-test Student (Paired o Unpaired), para los datos sin aparear cuando existen 2 grupos independientes, y el análisis de la varianza (ANOVA) (One-way y Two-way ANOVA), para comparar datos con más de dos variables en función del diseño experimental. Se utilizó el índice de significación p (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) para el estudio de las posibles diferencias significativas.

Resultados

5 RESULTADOS

Para una mejor organización el apartado de resultados se presenta dividido en dos capítulos. El primero corresponde al estudio de la HCI en ratas Wistar en el cual se comparan los efectos producidos por la HCI en dos edades diferentes: 3 y 20 meses. El segundo capítulo corresponde al primer estudio realizado sobre los efectos de la HCI en cobayas Hartley de 3 meses.

Capítulo I. Estudio de los efectos de la HCI en Rata 3M vs. 20M

5.1 Efecto de la HCI en el peso corporal

En primer lugar, se comprobó el efecto de la HCI en el peso de los animales jóvenes (3M) y viejos (20M) expuestos a este tratamiento, alimentados con dieta estándar propia de la especie y agua *ad libitum*. La **figura 33A** muestra el peso corporal de los cuatro grupos de animales del estudio al comienzo (0 días) y a los 15 días, sin o con exposición a HCI. Se observó un aumento de peso de las ratas controles 3M (C-3M), sin modificarse en las ratas jóvenes tras la exposición a HCI (HCI-3M); sin embargo, las ratas viejas mostraron una ligera pérdida de peso en los controles (C-20M) que se hizo más acusada tras el tratamiento de HCI (HCI-20M).

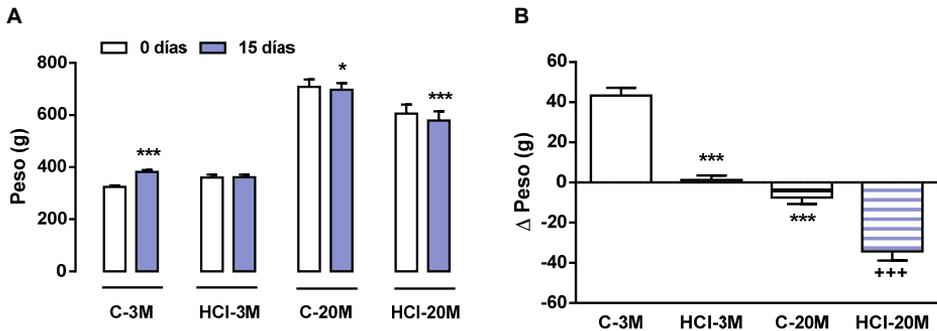


Figura 33. Peso corporal de las ratas Controles (C) y expuestas a Hipoxia Crónica Intermitente (HCI) de 3 meses (3M) y 20 meses (20M). **A.** Peso de los cuatro grupos de ratas a los 0 días y después de 15 días, sin y con exposición a HCI. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. 0 días (Paired t-test). **B.** Incremento del peso medio de las ratas después de 15 días sin y con exposición a HCI. *** $p < 0.001$ vs. C-3M; +++ $p < 0.001$ vs. C-20M (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=8).

En la **figura 33B** se muestra el incremento de peso medio alcanzado por los animales durante 15 días expuestos o no a HCl. Las ratas C-3M incrementaron su peso medio en 43 ± 4 g mientras que para las ratas HCl-3M el incremento de peso fue de 1 ± 2 g, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($***p<0.001$). También resultó significativa la pérdida de peso de las ratas C-20M con respecto a los controles 3M ($***p<0.001$). Las ratas C-20M perdieron una media de 7 ± 3 g y las ratas viejas tras la HCl perdieron una media de 34 ± 5 g ($***p<0.001$). En resumen, la HCl suprimió la ganancia de peso en las ratas jóvenes y promovió la pérdida de peso en las viejas.

5.2 Gasometría y pH en sangre arterial durante el ciclo de HCl

Los ciclos de HI generan cambios en la gasometría sanguínea como consecuencia de los distintos porcentajes de O_2 que se respiran en el interior de la cámara de exposición a hipoxia a corto y a largo plazo. Dichos cambios podrían ser diferentes en ratas no expuestas (C) o tras 15 días de exposición a HCl, y también con dependencia de la edad. Por ello, se realizó un estudio en ratas jóvenes y viejas, C y expuestas a HCl, para analizar el patrón de varios parámetros sanguíneos: PaO_2 , $PaCO_2$, pH y bicarbonato, determinados simultáneamente en muestras de sangre arterial obtenidas por cateterismo a través de la arteria carótida común.

En la **figura 34A** se muestran las PaO_2 obtenidas para distintos porcentajes de O_2 medidos a lo largo del ciclo de HI (40s de hipoxia/80s aire) en la cámara: 21, 15 y 12% O_2 , hasta el nadir del 5% O_2 seguido de la recuperación a los mismos porcentajes de O_2 . No se observaron diferencias significativas cuando la atmósfera respirable fue del 21% O_2 , ni al comienzo ni al final del ciclo de HI, en los cuatro grupos de animales. A medida que el porcentaje de O_2 disminuía en la cámara, la PaO_2 en los animales controles jóvenes y viejos fue cayendo aproximadamente de 90 a 25mmHg. En los animales HCl cuando el porcentaje fue del 15% O_2 la PaO_2 en las ratas viejas fue mayor que en los controles de su misma edad (88 ± 4 mmHg vs. 61 ± 5 mmHg, respectivamente; $*p<0.05$). El tratamiento con HCl mantuvo unas PaO_2 por encima de las de sus controles, efecto más pronunciado en las viejas que en las jóvenes, lo que sugiere una mayor hiperventilación o un menor consumo de O_2 . Obsérvese el efecto del 12% O_2 en los animales expuestos a HCl afectando mucho más a los animales jóvenes (30 ± 5 mmHg) que en los viejos (57 ± 8 mmHg; $\#p<0.05$). Sin embargo, en la recuperación al pasar del 5% O_2 al 21% O_2 se observó lo contrario, los animales jóvenes HCl normalizaron antes su PaO_2 , es decir, hiperventilaron mejor.

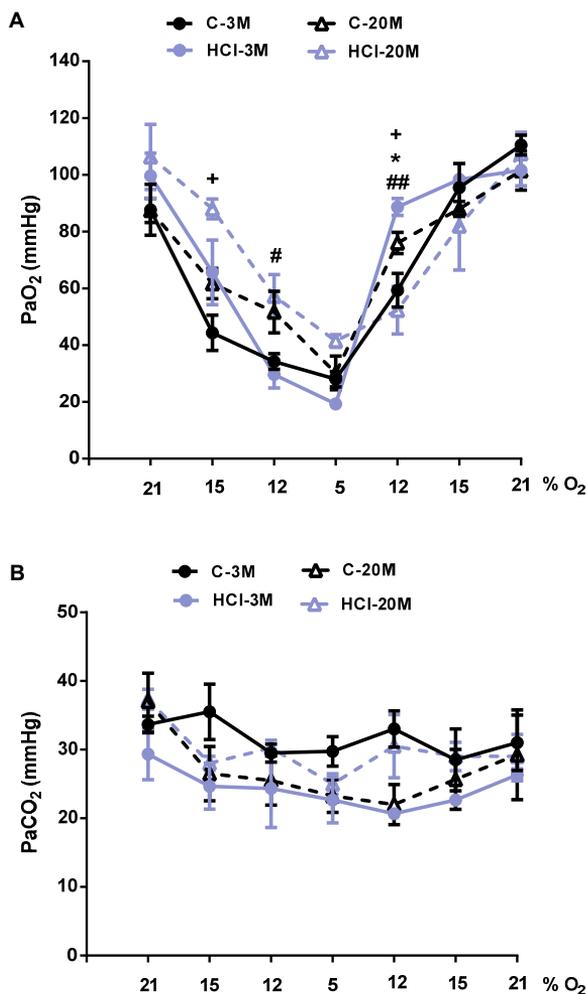


Figura 34. A. Evolución de la PaO₂, expresada en mmHg, durante el ciclo de HCl en ratas jóvenes (3M) y viejas (20M), controles y tras la exposición a HCl. #p<0.05, ##p<0.01 HCl-20M vs. HCl-3M; *p<0.05 HCl-3M vs. C-3M; *p<0.05 HCl-20M vs. C-20M (Two-way ANOVA). **B.** Evolución de la PaCO₂, expresada en mmHg, durante el ciclo de HCl en ratas jóvenes (3M) y viejas (20M), controles y tras la exposición a HCl. En ambas figuras el eje X representa el porcentaje de O₂ respirado por el animal para el cual se obtuvo una PaO₂ o una PaCO₂ representadas en el eje Y de la figura A y B, respectivamente. Los datos están expresados como la media ± SEM (n=4).

La **figura 34B** muestra los niveles de PaCO₂ obtenidos a la vez que los de PaO₂, y, por tanto, en las condiciones ya descritas. No se observaron diferencias significativas en la PaCO₂ entre los cuatro grupos de animales estudiados, aunque la tendencia observada fue una PaCO₂ más baja en los animales HCl de 3 meses que en los controles de la misma edad, prácticamente en todos los puntos del ciclo de HCl medidos.

Al contrario ocurrió con los animales de 20 meses de edad con una PaCO_2 menor en los controles.

En las mismas muestras sanguíneas se obtuvieron los valores de pH y bicarbonato. En la **tabla 5** se observa el pH a 21 y 5% O_2 en los animales 3M y 20M, C e HCl. El pH osciló ligeramente en los cuatro grupos de animales, sin embargo resultó significativo el pH más ácido en normoxia de las ratas 3M tras la exposición a HCl (* $p < 0.05$). Los valores de pH en el punto más bajo de O_2 (5% O_2) prácticamente coincidieron en los cuatro grupos con una tendencia a alcalinizarse, probablemente por hiperventilación. En condiciones de normoxia, las ratas HCl-3M tuvieron valores de HCO_3^- significativamente menores respecto a los controles de su misma edad (* $p < 0.05$).

	pH		HCO_3^- (mmol/L)
	21% O_2	5% O_2	21% O_2
C-3M	7.42 ± 0.02	7.49 ± 0.03	21.3 ± 0.3
HCl-3M	7.34 ± 0.01*	7.50 ± 0.03	15.7 ± 1.3*
C-20M	7.34 ± 0.02	7.48 ± 0.04	20.0 ± 1.0
HCl-20M	7.35 ± 0.02	7.48 ± 0.02	19.0 ± 0.6

Tabla 5. pH y bicarbonato (HCO_3^-), expresado como mmol/L, medidos en sangre arterial durante el ciclo de HCl a 21 y 5% O_2 en ratas jóvenes (3M) y viejas (20M), controles y tras la exposición a HCl. * $p < 0.05$ vs. C-3M (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media ± SEM (n=4).

Una medida indirecta proporcionada por el medidor de gases utilizado fue la St. HbO_2 , pero debido a que el equipo está diseñado para sangre humana con una $P_{50} = 30\text{mmHg}$ diferente a la de la rata ($P_{50} = 50\text{mmHg}$) los valores obtenidos no fueron reales y no se han considerado en este estudio.

5.3 Parámetros respiratorios y consumo de O_2

Se evaluó la ventilación pulmonar a través de un equipo de pletismografía de cuerpo entero de las ratas 3M y 20M en dos momentos diferentes, antes (HCl0) y después de la exposición a HCl (HCl15), respirando durante 10 min: aire (21% O_2), distintas intensidades de hipoxia (12% O_2 , 10% O_2 y 7% O_2) e hipercapnia (5% CO_2). La respuesta ventilatoria se estudió mediante el registro continuo de la FR y el VC, y el cálculo del VM.

En la **figura 35A** se muestra la frecuencia respiratoria. Aunque todos los estímulos probados aumentaron la FR, se observó una pérdida significativa de la respuesta ante el estímulo hipóxico del 12%O₂ debida a la exposición a HCl en los animales jóvenes y viejos. Los valores fueron de 160 ± 10 respiraciones/min en HCl0-3M y 123 ± 5 respiraciones/min en HCl15-3M (**p<0.001), y de 138 ± 9 respiraciones/min en HCl0-20M y 110 ± 9 respiraciones/min en HCl15-20M (**p<0.01). También fue significativa la pérdida de respuesta generada por el estímulo hipercápnico en los animales jóvenes HCl15 con respecto a la respuesta que tuvieron antes de la exposición a HCl. La FR en hipercapnia fue de 146 ± 8 y 119 ± 4 respiraciones/min antes y después de 15 días de HCl (**p<0.01), respectivamente. Por otro lado, la FR de las ratas viejas en el estímulo hipóxico del 10%O₂ fue significativamente menor comparándola con las ratas jóvenes con 170 ± 5 respiraciones/min en HCl0-3M y 145 ± 8 respiraciones/min en HCl0-20M (*p<0.05).

La **figura 35B** muestra el volumen corriente corregido por el peso. Al igual que la FR el VC aumentó y fue estadísticamente significativo en los cuatro grupos de animales cuando se realizó el test de hipoxia aguda al 7%O₂ y a la hipercapnia (5%CO₂) (###p<0.001).

El volumen minuto, expresado como mL/min/kg, representa el producto de la FR y el VC obtenidos en las ratas respirando las distintas mezclas de gases (**Figura 35C**). Se observó que todas las mezclas de gases produjeron un aumento de la ventilación con respecto a la condición de normoxia (Basal), como cabría esperar. Este aumento fue estadísticamente significativo en los dos grupos de animales, antes y después de la HCl, en 12, 10 y 7%O₂, y 5%CO₂ (###p<0.001); sin embargo, la ventilación basal no se vio afectada por la HCl ni en jóvenes ni en viejos. La ventilación de las ratas viejas en HCl0 disminuyó en todas las condiciones comparándola con los controles jóvenes en ese momento (**p<0.01 en Basal y ***p<0.001 en hipoxia e hipercapnia). La HCl tampoco afectó a los animales viejos cuando se sometieron al test de hipoxia e hipercapnia, excepto en el test del 12%O₂ donde el VM disminuyó de 586 ± 22 a 460 ± 22mL/min/kg (**p<0.01). Sin embargo, fueron las ratas jóvenes tras la HCl las que mostraron una disminución en la ventilación ante varios de los estímulos probados comparados con su respuesta inicial (HCl0). En el 12%O₂ el VM fue de 852 ± 40 y 667 ± 18mL/min/kg (**p<0.01); en 10%O₂ fue de 1077 ± 39 y 887 ± 28mL/min/kg (**p<0.01); en 5%CO₂ fue de 1080 ± 50 y 882 ± 28mL/min/kg (***p<0.001) antes y después de la HCl, respectivamente.

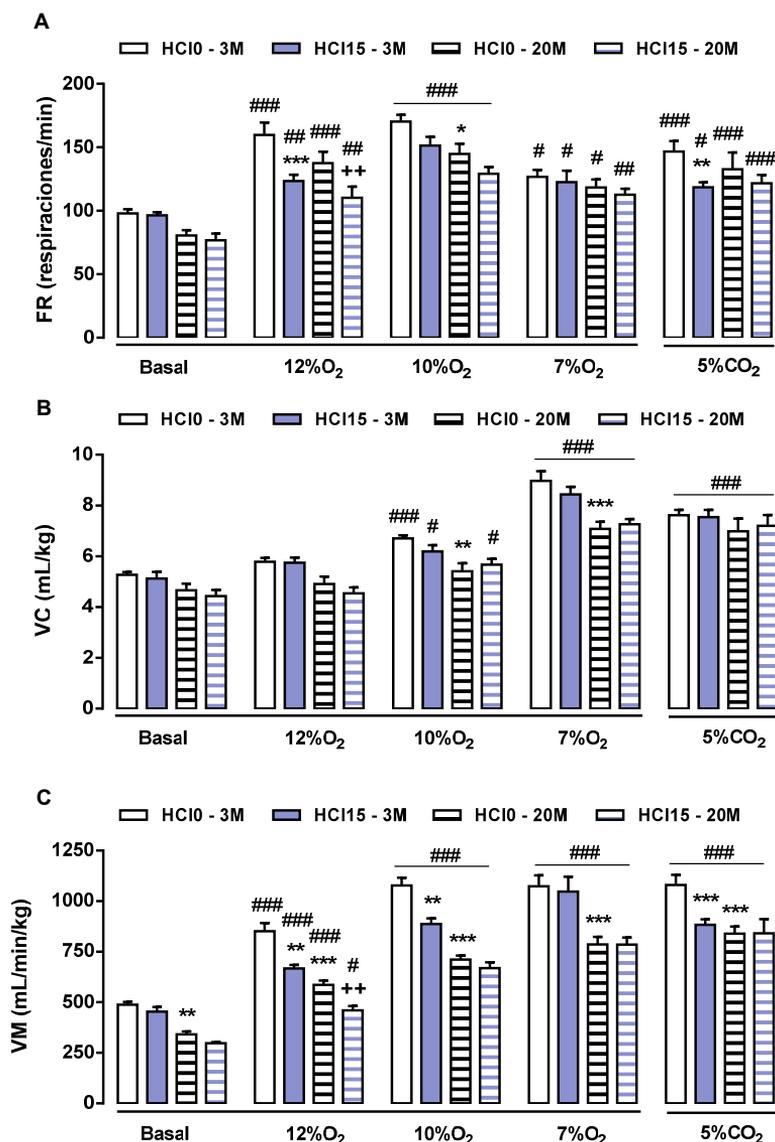


Figura 35. Parámetros respiratorios medidos por pletismografía en ratas jóvenes (3M) y viejas (20M) antes (HCl0) y después (HCl15) de la exposición a HCl. **A.** Frecuencia respiratoria (FR), expresada como respiraciones por minuto, **B.** Volumen corriente (VC), expresado como mL/kg, y **C.** Volumen minuto (VM), expresado como mL/min/kg, de ratas 3M y 20M a 0 días (HCl0) y después de 15 días de exposición a HCl (HCl15) en normoxia (Basal), en respuesta a test de hipoxia aguda (12%O₂, 10%O₂, 7%O₂) e hipercapnia (5%CO₂). #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs. Basal de cada grupo (One-way ANOVA); *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. HCl0-3M; **p<0.01 vs. HCl0-20M (Two-way ANOVA). Los datos están expresados como la media ± SEM (n=8).

La respuesta al 7%O₂ no se vio alterada por la HCl ya que los valores de ventilación en las ratas jóvenes antes y después del tratamiento de HCl fueron similares (1074 ± 54 y 1048 ± 72mL/min/kg ($p > 0.05$), respectivamente). En la respuesta a la hipercapnia se observó también una disminución significativa tras la exposición a HCl solo en las ratas jóvenes (882 ± 28mL/min/kg en HCl-3M vs. 1080 ± 50mL/min/kg en C-3M; ### $p < 0.001$).

Además de los parámetros de ventilación pulmonar, se midió el consumo de O₂ (metabolismo). La **figura 36A** representa el VO₂, expresado como mL/min/kg, en las mismas condiciones descritas anteriormente.

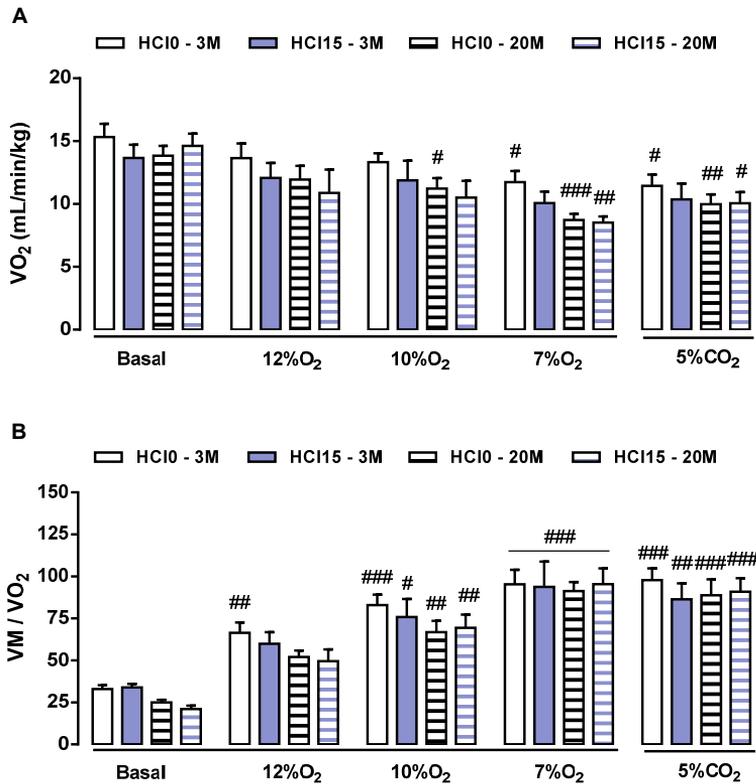


Figura 36. A. Consumo de O₂ (VO₂), expresado como mL/min/kg. **B.** Ventilación normalizada con el VO₂ mediante el *ratio* VM/VO₂, en normoxia (Basal) y en respuesta a test de hipoxia aguda (12%O₂, 10%O₂, 7%O₂) e hipercapnia (5%CO₂). # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ vs. Basal de cada grupo (One-way ANOVA). Los datos están expresados como la media ± SEM (n=8).

Se observó que los animales viejos disminuyeron significativamente su metabolismo cuando respiraron 7%O₂ antes y después de la exposición a HCl ($14.7 \pm 1.0\text{mL/min/kg}$ respirando 21%O₂ vs. $8.7 \pm 0.5\text{mL/min/kg}$ respirando 7%O₂ en HCl0-20M (###p<0.001) y $14.6 \pm 1.0\text{mL/min/kg}$ respirando 21%O₂ vs. $8.5 \pm 0.5\text{mL/min/kg}$ respirando 7%O₂ en HCl15-20M (##p<0.01)). De igual manera ocurrió cuando la atmósfera respirable fue de 5%CO₂, aunque en este caso la disminución fue menor ($10.0 \pm 0.8\text{mL/min/kg}$ en HCl0-20M (##p<0.01) y $10.0 \pm 0.9\text{mL/min/kg}$ en HCl15-20M (#p<0.05)) respecto al consumo de O₂ basal.

En la **figura 36B** se representan los datos de ventilación normalizados con el consumo de O₂ mediante el *ratio* VM/VO₂, de manera que se pueda observar si se produce o no hiperventilación en las condiciones ya descritas. Se muestra que los animales jóvenes antes de la exposición a HCl hiperventilaron ya desde el estímulo hipóxico más moderado (12%O₂; ##p<0.01) y las ratas jóvenes HCl15 y viejas HCl0 e HCl15 hiperventilaron al 10 y 7%O₂. La mezcla hipercápnica produjo hiperventilación frente a los valores basales en todas las situaciones. Sin embargo, no se observó sensibilización.

5.4 Respuesta del cuerpo carotídeo tras la exposición a HCl

En el apartado anterior se estudió la activación del reflejo quimiorreceptor mediado por el CC a través de su efecto sobre la función ventilatoria. En este apartado se explora la respuesta de las CQ de CC de las ratas jóvenes y viejas tras la exposición a HCl midiendo los cambios de Ca²⁺_c y su actividad secretora de CA frente al estímulo hipóxico.

5.4.1 Síntesis de catecolaminas y secreción ante un estímulo hipóxico

En la **figura 37** se muestra la síntesis de CA a partir de ³H-Tyr, expresada como pmol de NE o DA por mg de tejido en una hora, de CC de ratas de 3M y 20M, control y tras la exposición a HCl. La síntesis de NE fue similar en los cuatro grupos analizados. Sin embargo, en los animales jóvenes tras la HCl se observó una disminución de la síntesis de DA con respecto a los controles de su misma edad. Los valores obtenidos fueron de $47.3 \pm 8.7\text{pmol/mg/h}$ y $24.9 \pm 3.7\text{pmol/mg/h}$ en CC de ratas jóvenes controles y tras la exposición a HCl (**p<0.01), respectivamente.

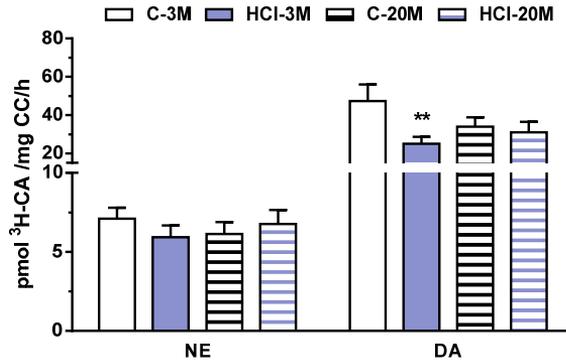


Figura 37. Síntesis de norepinefrina (NE) y dopamina (DA), expresado como pmol/mg CC/h, de CC de ratas C e HCl, 3M y 20M. ** $p < 0.01$ vs. C-3M (Two-way ANOVA). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=5).

La **figura 38** representa la secreción evocada de CA en el CC, tras el marcaje con tritio de sus depósitos, por un estímulo hipóxico ($5\%O_2$) expresada como % de contenido del tejido. La exposición a HCl duplicó la secreción de 3H -CA ante el estímulo hipóxico en CC de ratas jóvenes y la triplicó en las viejas. Los CC de las ratas HCl-3M liberaron $13.9 \pm 3.0\%$ (** $p < 0.01$) y los de las ratas HCl-20M $13.6 \pm 1.5\%$ de CA (** $p < 0.01$). Sin embargo, los CC de las ratas de 20M secretaron menos 3H -CA que los CC de las ratas 3M, $4.3 \pm 0.4\%$ y $5.9 \pm 0.6\%$ (* $p < 0.05$), respectivamente.

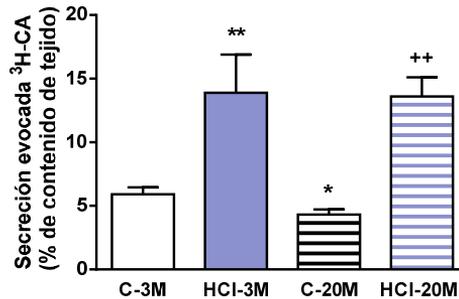


Figura 38. Secreción evocada de 3H -CA, expresado como % del contenido de CC, en respuesta a $5\%O_2$ en CC de ratas jóvenes (3M) y viejas (20M), controles y tras la exposición a HCl. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. C-3M; ** $p < 0.01$ vs. C-20M (unpaired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=6).

5.4.2 Medida de Ca^{2+} citosólico en células quimiorreceptoras

La exocitosis de neurotransmisores está mediada por el aumento de Ca^{2+} intracelular necesario para la secreción. Por ello se determinaron los cambios de Ca^{2+} citosólico en respuesta a dos estímulos (hipoxia y alto K^+) en CQ procedentes de cultivos frescos de CC disociados. En la **figura 39A** se muestra un registro único representativo del experimento donde se observa la variación de Ca^{2+}_c en respuesta a la hipoxia (gaseosa con N_2) y a 35mM de K^+ . Los datos están expresados como el *ratio* 340/380nm.

En la **figura 39B** se representa la medida de Ca^{2+}_c en las CQ de CC controles y experimentales de ratas 3M y 20M en respuesta a la hipoxia. Se representa la integración de las respuestas obtenidas en los registros. Para ello las señales se desplazan electrónicamente a cero (línea roja) y el software integra el área bajo la curva respecto a esa basal normalizada por el tiempo de aplicación del mismo (2 min para el N_2 y 1 min para el K^+). Se observó cómo la hipoxia produjo un aumento de Ca^{2+}_c en los cuatro grupos estudiados, pero como ocurrió en la secreción de CA en CC de ratas viejas, tuvieron una respuesta significativamente menor frente al control joven (** $p < 0.01$). La HCl no produjo cambios en la medida de Ca^{2+}_c en las ratas jóvenes 3M, sin embargo, hizo que aumentara en las CQ de CC de ratas 20M (* $p < 0.05$).

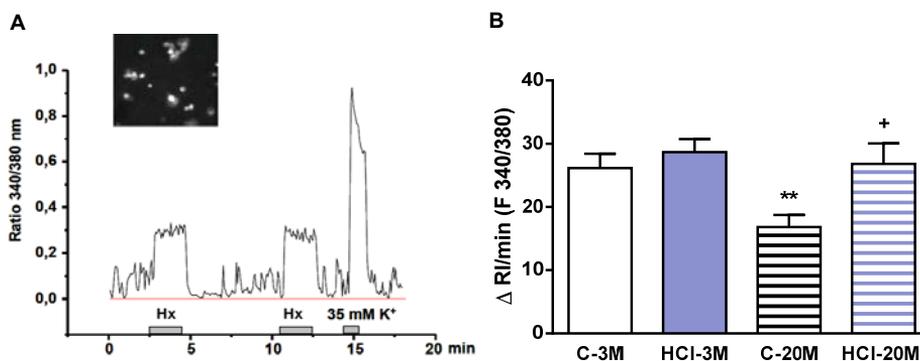


Figura 39. A. Registro único de los niveles de Ca^{2+}_c en una CQ de CC control joven con Fura-2-AM, expresado como el *Ratio* 340/380nm. La imagen insertada en la parte superior de la misma figura muestra células estimuladas con hipoxia (Hx). **B.** Niveles de Ca^{2+}_c , expresado como incremento de la respuesta integrada/min, en CQ de CC de ratas de 3 y 20 meses de edad, controles y tras la exposición de HCl, en respuesta a hipoxia (95% N_2 /5% CO_2) ** $p < 0.01$ vs. C-3M; * $p < 0.05$ vs. C-20M (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=41-52).

5.5 Actividad cardiovascular tras la exposición a HCl

5.5.1 Efecto sobre la presión arterial sistémica

Se midió la presión arterial sistémica en los cuatro grupos de ratas objeto del estudio ya que, como se ha descrito en la introducción, la HCl produce hipertensión arterial y, por lo tanto, es un parámetro de medida imprescindible para validar nuestro modelo de HCl. Además, se realizó un test de hipoxia aguda del 10%O₂ durante 3 min (**Figura 40A**). Los resultados obtenidos se representan en la **figura 40B**. La HCl produjo un aumento en la PAS aproximadamente del 45% solo en las ratas jóvenes. La PAS fue de 101 ± 7mmHg en C frente a 139 ± 9mmHg en HCl (**p<0.01). Las ratas controles viejas presentaron una PAS mayor, estadísticamente significativa, que las ratas jóvenes controles (152 ± 6mmHg; ***p<0.001). En estas ratas viejas la HCl no produjo un aumento adicional de presión (140 ± 7mmHg; p>0.05). Cuando se evaluó el test de hipoxia aguda (10%O₂) se observó una disminución clara de la presión en los cuatro grupos de animales llegando incluso a igualarse las presiones en los animales jóvenes controles y expuestos a HCl.

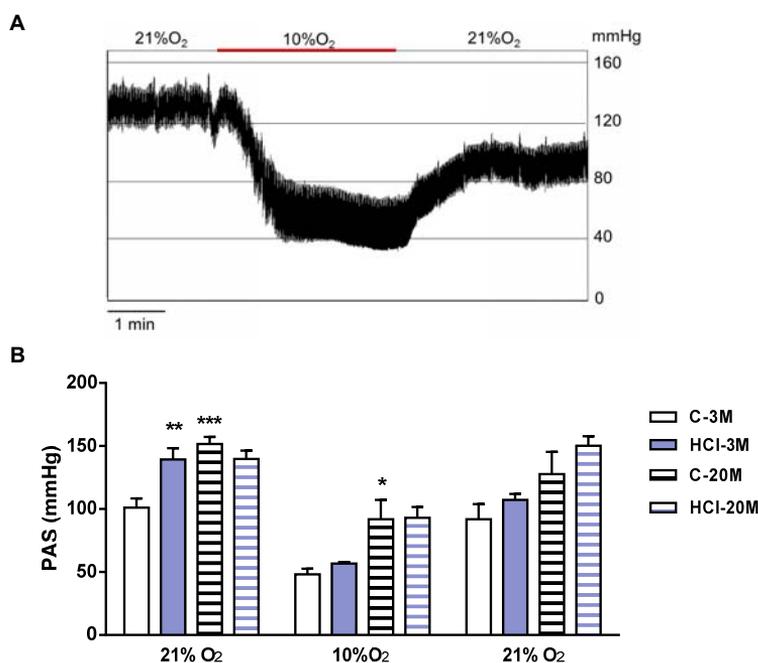


Figura 40. A. Registro único de presión arterial media (PAS) de una rata joven control. **B.** PAS medida por cateterización de la arteria carótida de ratas de 3 y 20 meses, C e HCl, en aire (21%O₂) e hipoxia aguda (10%O₂; 3min). **p<0.01, ***p<0.001 vs. 21%O₂ C-3M; *p<0.05 vs. 10%O₂ C-3M (Two-way ANOVA). Los datos están expresados como la media ± SEM (n=8).

5.5.2 Frecuencia cardíaca

La **figura 41** muestra los resultados de frecuencia cardíaca, expresada como latidos por minuto, y la relación entre el peso del ventrículo izquierdo y el septum con el peso total del corazón. No se observaron diferencias en ambas medidas en ninguno de los cuatro grupos de animales. Los valores de FC se encontraron sobre los 400 latidos por minuto. Aunque las ratas viejas tras la HCl tendieron a disminuir su FC, este resultado no fue estadísticamente significativo. La HCl generó un ligero aumento del ventrículo izquierdo en las ratas jóvenes, pero no en las viejas.

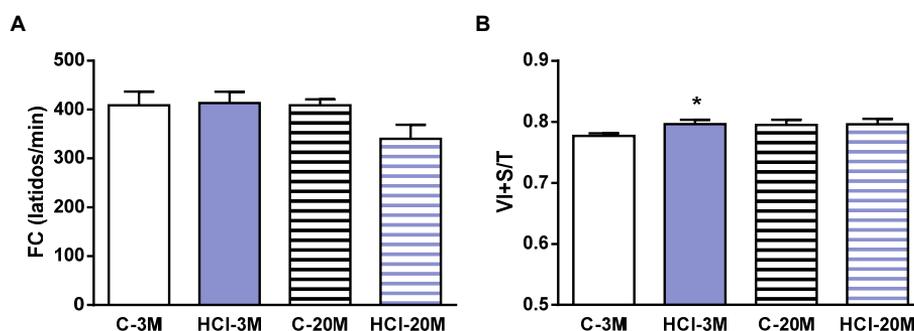


Figura 41. **A.** Frecuencia cardíaca (FC), expresada como latidos por minuto, medida en la arteria carótida mientras los animales respiran aire (21%O₂). **B.** Relación entre el ventrículo izquierdo más el septum (VI+S) y el total del corazón (T), de las ratas de 3 y 20 meses, C y expuestas a HCl. Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=8-12).

5.6 Respuesta vasomotora de la carótida tras la exposición a HCl

Debido a los resultados mostrados anteriormente sobre la PAS, donde la HCl produjo un aumento de la presión en los animales jóvenes no observada en los viejos, los cuales ya presentaban hipertensión, se planteó medir la respuesta vasomotora *in vitro* de una arteria sistémica, la arteria carótida, en los cuatro grupos de animales. Este estudio se llevó a cabo mediante la técnica de miografía de alambre midiendo la relajación con carbacol, agonista muscarínico.

La **figura 42A** muestra un registro único de un protocolo tipo realizado en una arteria carótida control de una rata joven. Las contracciones se realizaron con alto K⁺ y fenilefrina y la relajación con carbacol. En la **figura 42B** se muestra la respuesta a una solución salina fisiológica 80mM de K⁺, expresada en mN. Se observa una respuesta contráctil al K⁺ similar en los cuatro tipos de arterias carótidas (\approx 4mN). En la **figura 42C**

se representa el porcentaje de relajación a carbacol ($3\mu\text{M}$) de arterias carótidas precontraídas con PE de animales jóvenes y viejos. No se encontraron diferencias significativas entre las arterias carótidas controles e HCl procedentes de los animales jóvenes y viejos, aunque se observó una tendencia clara a disminuir la relajación con la HCl y la edad. La relajación fue de $52 \pm 9\%$ en C-3M, $42 \pm 7\%$ en HCl-3M, $39 \pm 7\%$ en C-20M y $26 \pm 6\%$ en HCl-20M. Para comprobar si el efecto del carbacol estaba mediado por el NO se añadió un inhibidor de la eNOS, L-NAME, al medio de incubación; el L-NAME disminuyó la relajación $\sim 50\%$ en las arterias de los cuatro grupos de animales (resultados no mostrados).

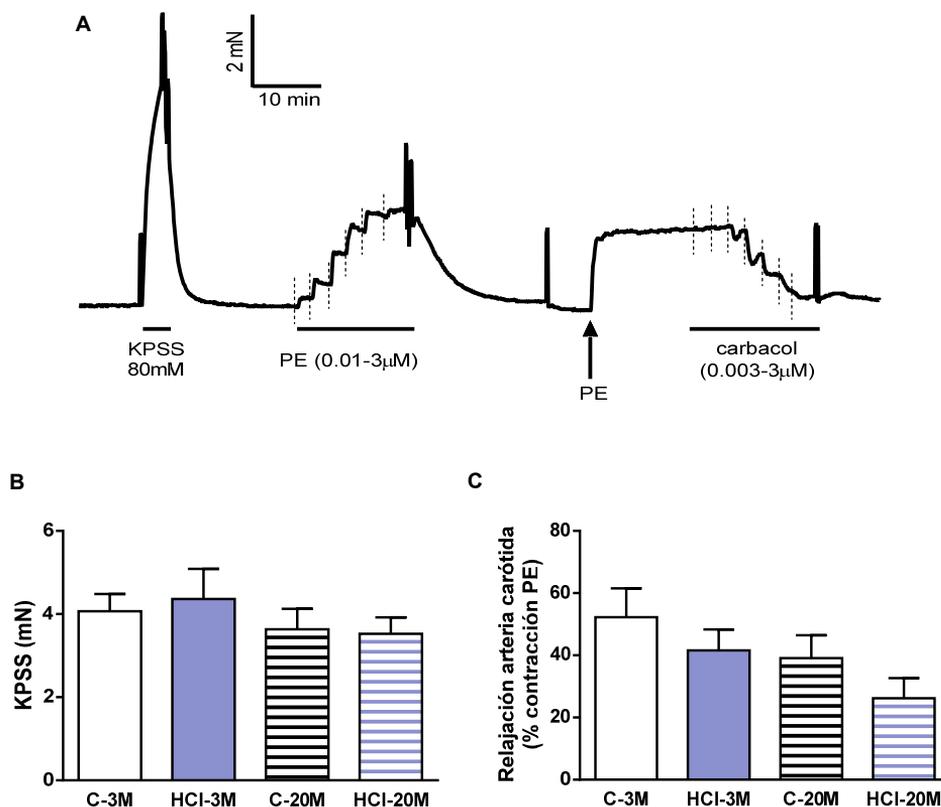


Figura 42. Función vasodilatadora de la arteria carótida de ratas jóvenes (3M) y viejas (20M), C e HCl. **A.** Registro único de un protocolo de una arteria control 3M. **B.** Respuesta a alto K^+ . **C.** Respuesta vasodilatadora a carbacol ($3\mu\text{M}$), expresado como porcentaje de relajación en la arteria precontraída con fenilefrina (PE; submáxima). Los datos están expresados como la media \pm SEM ($n=9-12$).

5.7 Morfología de la arteria carótida

Para el estudio morfológico de las arterias carótidas de los cuatro grupos de ratas se realizó la tinción tricrómica de Masson en secciones de arteria de $5\mu\text{m}$ de grosor. La tinción tricrómica de Masson muestra los núcleos en morado oscuro, el músculo en rosa y las fibras de colágeno en general en verde azulado. Con esta tinción se puede observar la capa muscular y el colágeno presente en las arterias y determinar el grosor de las mismas. La **figura 43** muestra una imagen de una arteria de los cuatro grupos de animales estudiados (C-3M, HCI-3M, C-20M y HCI-20M) realizada con el objetivo 4x, con una zona ampliada a la derecha de la misma imagen tomada con el objetivo 20x. Morfológicamente no se observaron diferencias entre los grupos de la misma edad, es decir, no hubo cambios producidos por la HCI en dichas arterias, aunque si se observaron diferencias entre las arterias de las distintas edades.

Para comprobar si la HCI había alterado la pared vascular, se utilizaron varias secciones de las arterias carótidas de los cuatro grupos de animales. Los resultados de las medidas del grosor de la pared y de la luz vascular se muestran en la **figura 44**. El grosor de la pared fue similar en C e HCI, al igual que el área de la luz del vaso medido en las arterias de animales de 3 meses de edad; la HCI no afectó a las características morfológicas propias de la arteria carótida de las ratas 3M. El otro grupo de arterias de 20 meses mostró un grosor mayor que el de las arterias carótidas de ratas 3M siendo esta diferencia significativa. El grosor de las arterias C-3M fue de $55.0 \pm 2.1\mu\text{m}$ y de $76.8 \pm 1.1\mu\text{m}$ en las C-20M (** $p < 0.01$). La HCI en ratas de 20 meses tampoco modificó el grosor ni la luz del vaso de las arterias carótidas.

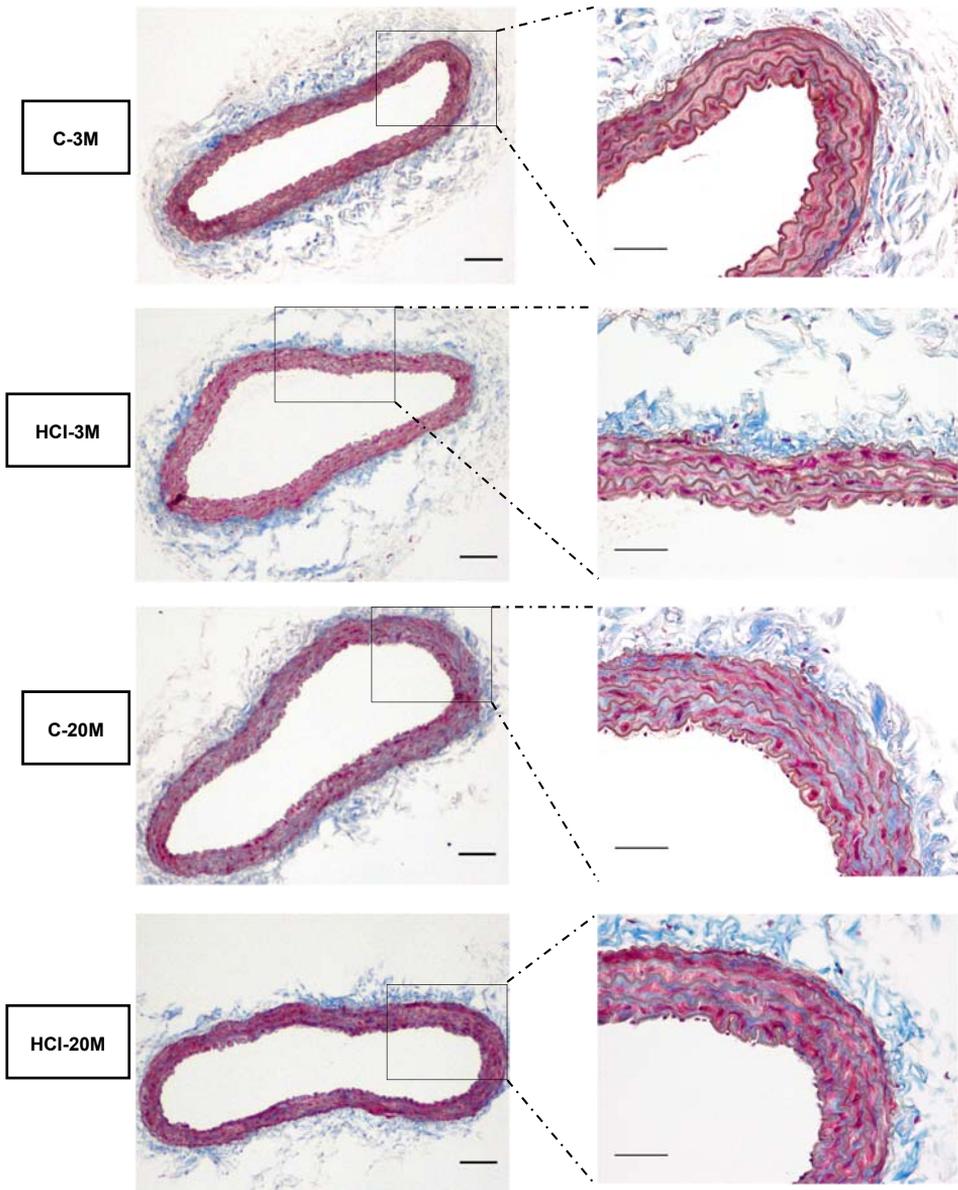


Figura 43. Morfología de la arteria carótida. Secciones de 5µm de una arteria carótida de una rata de 3 meses de edad, control (C-3M) e HCl (HCl-3M), y 20 meses de edad, control (C-20M) e HCl (HCl-20M) teñidas con tricrómico de Masson. A la izquierda la imagen realizada con el objetivo 4x. Barra de calibración 100 µm. A la derecha amplitud de una zona con el objetivo 20x. Barra de calibración 50µm.

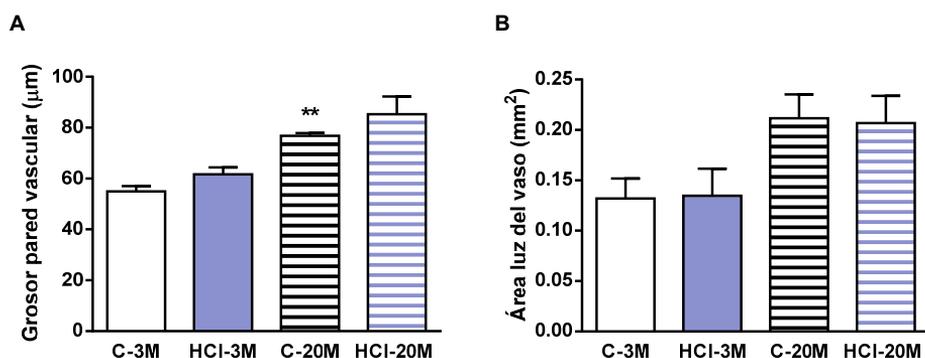


Figura 44. A. Grosor de la pared vascular, expresado en μm , y **B.** Área de la luz del vaso, expresado en mm^2 , de arterias carótidas de animales jóvenes (3M) y viejos (20M), C e HCl. ** $p < 0.01$ vs. C-3M (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM ($n=4-6$).

5.8 Biodisponibilidad del óxido nítrico

Como indicador de la disfunción endotelial, se estudió la biodisponibilidad de NO, midiendo el NO plasmático cuantificando los nitritos, metabolitos del NO, y la L-arginina, precursor natural del NO, y sus metabolitos, alguno inhibidor competitivo de la NOS.

5.8.1 Nitritos y nitratos en plasma

Para conocer la producción de NO después de la exposición a HCl en las ratas jóvenes y viejas, se midieron los niveles plasmáticos de nitritos como un índice de la producción de NO. Como muestra la **figura 45**, la concentración de nitritos, expresados en μM , en el plasma de las ratas jóvenes HCl fue mayor que el encontrado en el plasma de los controles de la misma edad, resultando esta diferencia estadísticamente significativa. En concreto los valores fueron de $16.2 \pm 1.6 \mu\text{M}$ en C y $22.5 \pm 2.1 \mu\text{M}$ en HCl (* $p < 0.05$). Sin embargo, en las ratas de mayor edad, la HCl no aumentó el nivel de nitritos incluso se pudo observar una tendencia a disminuir en este grupo de animales. Las concentraciones de nitritos en las ratas de 20 meses fueron de $18.9 \pm 3.0 \mu\text{M}$ y $13.6 \pm 2.4 \mu\text{M}$, C e HCl, respectivamente. El aumento de nitritos tras HCl está en discordancia con los datos publicados por otros autores^{242,243}.

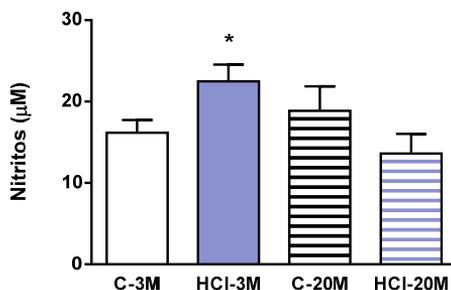


Figura 45. Nivel de nitritos en plasma de ratas de 3 y 20 meses de edad, C e HCl, expresado en concentración μM . * $p < 0.05$ vs. C-3M (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=8).

5.8.2 Arginina y derivados metilados en plasma

Como se ha comentado en la introducción, existen inhibidores endógenos de la eNOS que pueden reducir la biodisponibilidad del NO. La ADMA es el principal inhibidor y la SDMA, aunque no inhibe la eNOS, compete con la L-arginina ya que su presencia implica una disminución del sustrato para la eNOS. Aunque se producen en el citoplasma celular, se transportan al líquido extracelular por transportadores específicos de aminoácidos catiónicos. Por ello, se midieron simultáneamente los niveles plasmáticos de L-Arginina, ADMA y SDMA en los cuatro grupos de animales del estudio.

La **figura 46A** muestra que la exposición a HCl no produjo cambios significativos en los niveles de L-arginina plasmáticos con valores similares en los cuatro grupos de animales. La HCl solo afectó a las ratas jóvenes disminuyendo los niveles del metabolito de la L-arginina, SDMA. La concentración de SDMA en plasma procedente de ratas de 3 meses controles fue de $0.64 \pm 0.03 \mu\text{M}$ y en HCl de $0.53 \pm 0.01 \mu\text{M}$ (** $p < 0.01$). Con respecto a las ratas viejas controles los metabolitos de la L-arginina disminuyeron con respecto a los controles de menor edad. Los valores fueron: ADMA en C-3M de $0.82 \pm 0.04 \mu\text{M}$ y $0.65 \pm 0.03 \mu\text{M}$ en C-20M (** $p < 0.01$) (**Figura 46B**); SDMA en C-3M de $0.64 \pm 0.03 \mu\text{M}$ y $0.50 \pm 0.03 \mu\text{M}$ en C-20M (** $p < 0.01$) (**Figura 46C**). Los niveles de estos dos derivados metilados de la arginina en ratas viejas no se modificaron por el tratamiento HCl, con valores similares a los controles. Por último, la **figura 46D** representa el *ratio* entre los niveles de L-arginina y los de ADMA, es decir, el balance entre el precursor y el inhibidor de NO, respectivamente. Solo resultó significativo el aumento en las ratas de 20

meses frente a las de 3 meses (* $p < 0.05$); sin embargo, la HCl no modificó el *ratio* en ninguna de las dos edades de ratas estudiadas.

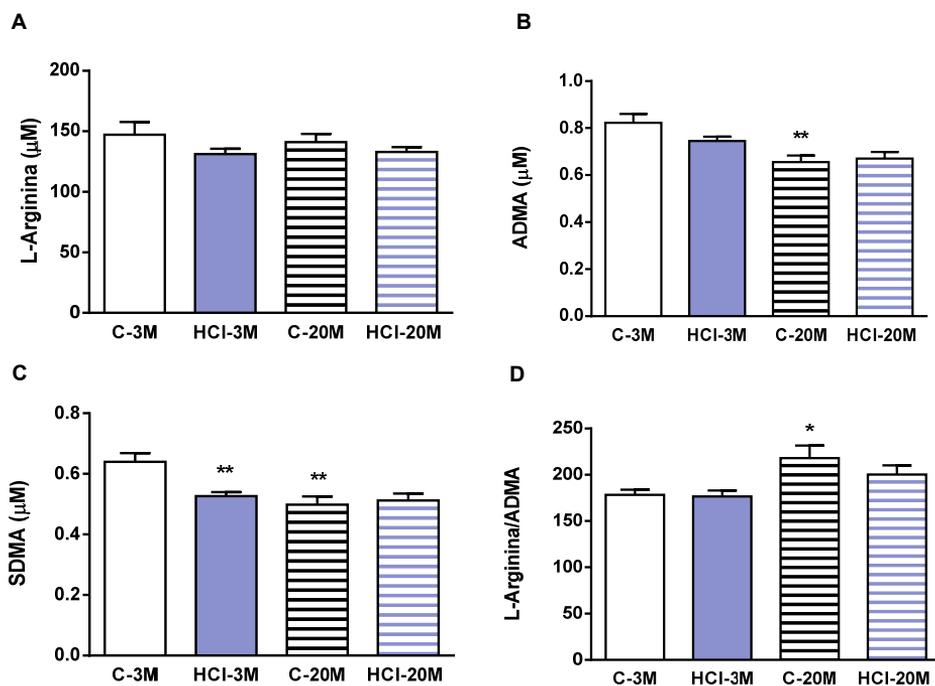


Figura 46. A. Niveles de L- Arginina, B. ADMA; dimetilarginina asimétrica y C. SDMA, dimetilarginina simétrica, expresados en μM y D. *Ratio* L-Arginina/ADMA, todos ellos medidos en plasma de ratas jóvenes (3M) y viejas (20M), C e HCl. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. C-3M (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=8).

5.9 Angiotensina II plasmática

Puesto que la angiotensina II (All) es un potente vasoconstrictor regulador de la presión arterial, se evaluó el efecto de la HCl sobre los niveles de All plasmáticos como posible responsable de la hipertensión arterial. Los valores obtenidos de All en plasma de ratas de 3 y 20 meses de edad, C e HCl, se representan en la **figura 47**, en la cual, se observa que la HCl aumentó significativamente los niveles de All en las ratas jóvenes y ligeramente en las ratas viejas. Los valores fueron $75.1 \pm 18.5\text{pg/mL}$ para los C-3M y $211 \pm 54.5\text{pg/mL}$ para los HCl (* $p < 0.05$). Los valores de All en las ratas viejas fueron: $22.5 \pm 5.5\text{pg/mL}$ para los C-20M y $44.9 \pm 12.4\text{pg/mL}$ para los HCl-20M, muy por debajo de los valores de las ratas jóvenes.

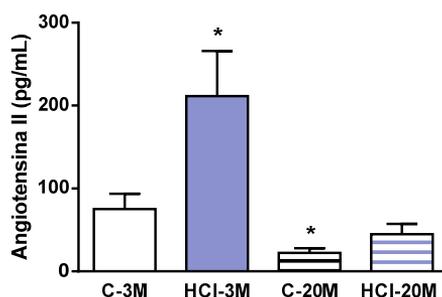


Figura 47. Niveles plasmáticos angiotensina II, expresado como pg/mL, de ratas jóvenes (3M) y viejas (20M), controles y tras la exposición a HCl. * $p < 0.05$ vs. C-3M (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=8-10).

Además de la AII elevada en las ratas jóvenes tras la exposición a HCl se observó un ligero aumento significativo en la concentración de Na^+ plasmático (* $p < 0.05$), sin cambios en el K^+ (tabla 6).

	Na^+ (mmol/L)	K^+ (mmol/L)
C-3M	145.0 \pm 0.53	3.60 \pm 0.09
HCl-3M	146.8 \pm 0.53*	3.69 \pm 0.11

Tabla 6. Niveles plasmáticos de Na^+ y K^+ , expresados como mmol/L, de ratas jóvenes (3M) controles y tras la exposición a HCl. * $p < 0.05$ vs. C-3M (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=10).

5.10 Papel de la dopamina en los efectos de la HCl

En este apartado de resultados se muestra el estudio realizado en ratas macho de 3 meses de edad expuestos a HCl tratados con el fármaco domperidona para comprobar su efecto sobre la PAS, aplicada de forma aguda y crónica. Como ya se ha comentado, la dopamina es un modulador de la sensibilidad de los quimiorreceptores arteriales, y por tanto del reflejo quimiorreceptor, actuando fundamentalmente a través de receptores D2 localizados en las CQ (autocrina) y en las terminaciones sensoriales del NSC (paracrina)^{284,285}. Muchos de los efectos de la apnea del sueño se han atribuido a la hiperactivación del CC sometido a ciclos recurrentes de hipoxia/reoxigenación. Por ello, se propuso evaluar los efectos de la domperidona, como antagonista de los receptores D2 presinápticos y postsinápticos, sobre las alteraciones cardiovasculares observadas

tras la exposición a HCl. Se eligió la domperidona porque no atraviesa la barrera hematoencefálica, actuando solo a nivel periférico cuando se le suministra *in vivo*.

Otros estudios realizados estuvieron encaminados a evaluar el papel de los receptores D2 sobre: la función del CC, la actividad simpática, el reflejo respiratorio, el estado redox, etc. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes y no se han incluido en esta tesis.

5.10.1 Efecto crónico de la domperidona sobre la PAS

En un grupo de ratas jóvenes se evaluó el efecto crónico de la domperidona sobre la PAS, administrando el fármaco disuelto en el agua de bebida (0.75mg/día), a los C y a los expuestos a HCl, durante los últimos 15 días de exposición a HCl. La exposición a la HCl se realizó durante 30 días y se suplementó el agua de bebida con domperidona a la mitad de las ratas en HCl. En la **figura 48** se muestra la PAS de los cuatro grupos: C-3M, C-3M DOM, HCl-3M e HCl-3M DOM. Se observó que el efecto crónico del fármaco produjo una disminución clara de la PAS tanto en los C como en los HCl, aproximadamente de un 30%. La PAS de los C fue de 96 ± 10 mmHg y con domperidona 70 ± 4 mmHg ($*p < 0.05$) y la PAS de los HCl fue de 148 ± 11 mmHg y tratados con domperidona de 101 ± 10 mmHg ($*p < 0.05$).

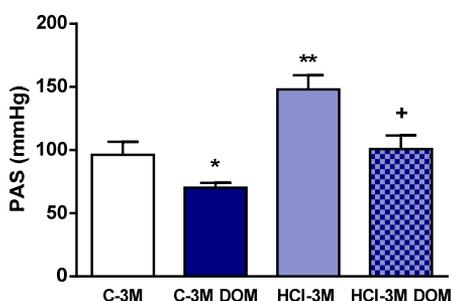


Figura 48. Efecto crónico sobre la presión arterial sistémica (PAS) de la domperidona (DOM; 0.75mg/día) suplementado en el agua de bebida durante 15 días de ratas jóvenes de 3 meses, C y expuestas a HCl durante 30 días. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ vs. C-3M; $+p < 0.05$ vs. HCl-3M (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=7-9).

5.10.2 Efecto agudo de la domperidona sobre la PAS

En un grupo independiente de ratas de 3 meses de edad divididas en dos grupos: controles y expuestas a HCl durante 21 días, se realizó un estudio sobre el efecto agudo de una dosis de domperidona de 2.5mg/kg (administrado i.p.). La **figura 49A** representa un registro de presión de una rata HCl y el efecto del uso de la domperidona en la misma. En la **figura 49B** se muestra la PAS de los dos grupos de animales y el efecto de la domperidona sobre la misma. La domperidona en los animales C-3M no modificó la PAS, sin embargo, la PAS en las ratas HCl-3M disminuyó significativamente tras la inyección de domperidona, en concreto de 140 ± 4 mmHg a 92 ± 7 mmHg ($+++p<0.001$).

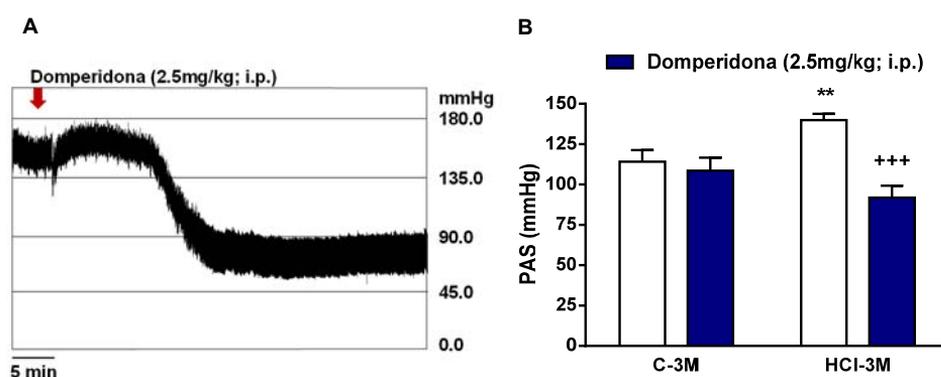


Figura 49. A. Registro de presión arterial de una rata HCl y el efecto agudo de la domperidona. **B.** Efecto agudo de la domperidona (2.5mg/kg; intraperitoneal) sobre la presión arterial sistémica media (PAS) de ratas jóvenes de 3 meses, C e HCl de 15 días. $**p<0.01$ vs. C-3M sin domperidona (Unpaired t-test); $+++p<0.001$ vs. HCl-3M sin domperidona (Paired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM ($n=6-9$).

5.11 Efectos pulmonares de la HCl

5.11.1 Efecto de la HCl sobre la presión arterial pulmonar

Se sabe que la apnea del sueño en humanos y la HCl en ratas produce un aumento de la PAS, como se mostró anteriormente, sin embargo, sus efectos sobre la presión arterial pulmonar no están tan claros. Por ello, se midió la PAP en las ratas jóvenes de 3 meses, controles y tras la exposición a HCl durante 21 días. Además, se comparó con un grupo de ratas de la misma edad expuestas a hipoxia crónica sostenida (HCS) modelo experimental habitual de hipertensión pulmonar. Los resultados obtenidos están representados en la **figura 50A**, que muestra que la HCl indujo un ligero aumento

significativo en la PAP media frente a los controles. Los valores fueron de 12.8 ± 0.5 mmHg en C-3M y 15.2 ± 0.6 mmHg en HCl-3M ($*p < 0.05$). Sin embargo, este aumento en la PAP por la HCl fue menor que el producido por la HCS en ratas de 3 meses con un valor de 16.7 ± 0.6 mmHg ($***p < 0.001$).

En la **figura 50B** se muestra la respuesta VPH en los tres grupos de animales. La HCl no alteró la respuesta a la VPH frente al control mientras respiraban $10\%O_2$ durante 3min; sin embargo, fue en HCS donde la respuesta a la VPH se perdió en $10\%O_2$ y respondió ligeramente cuando el test hipóxico fue del $7\%O_2$, como cabría esperar puesto que el tratamiento de HCS se realizó durante 15 días a $10\%O_2$.

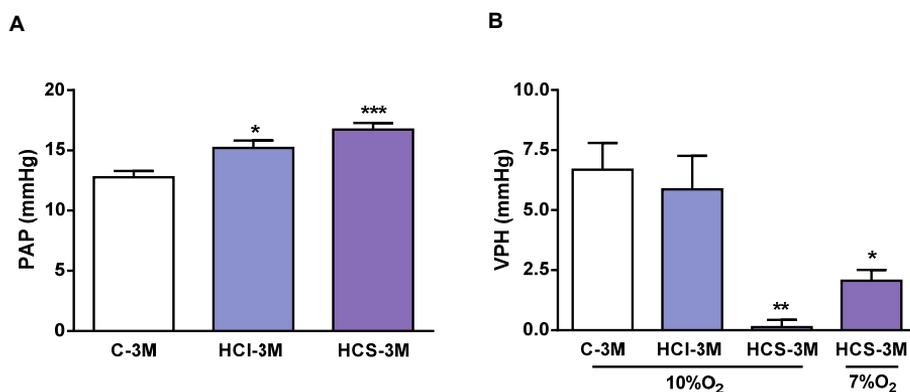


Figura 50. A. Presión arterial pulmonar (PAP) medida por cateterización de la arteria pulmonar de ratas de 3 meses, C, HCl e HCS mientras respiran aire ($21\%O_2$). **B.** Vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH) inducida a las ratas C e HCl mientras respiran $10\%O_2$ y en ratas HCS mientras respiran 10 y $7\%O_2$, durante 3 min. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ vs. C-3M (Unpaired t-test) Los datos están expresados como la media \pm SEM ($n=6-18$).

5.11.2 Respuestas vasculares de la arteria pulmonar tras la HCl

La **figura 51A** muestra la respuesta contráctil vascular a dosis acumulativas de fenilefrina (PE; $0.01-3.0 \mu M$) en la arteria pulmonar, expresado como el % de la respuesta a una solución salina fisiológica $80mM$ de K^+ , la cual fue similar en las arterias pulmonares de animales expuestos a HCl o HCS en comparación con los controles. La contracción inducida por PE fue mayor en las arterias pulmonares de los animales expuestos a hipoxia, ya sea HCl ($*p < 0.05$), o más marcadamente en el grupo HCS ($***p < 0.001$) que en el grupo control.

La **figura 51B** representa la relajación a dosis acumulativas de carbacol ($0.003-3\mu M$) expresado como porcentaje de relajación de la arteria carótida precontraída con PE ($10\mu M$) de los animales C, HCl e HCS. Se observó que el comportamiento en la

relajación de las arterias pulmonares fue similar entre animales C e HCl y diferente en los HCS (** $p < 0.001$). A medida que la concentración de carbacol aumentó la relajación fue menor en los HCS comparándolo con el C, indicando disfunción endotelial en estas arterias.

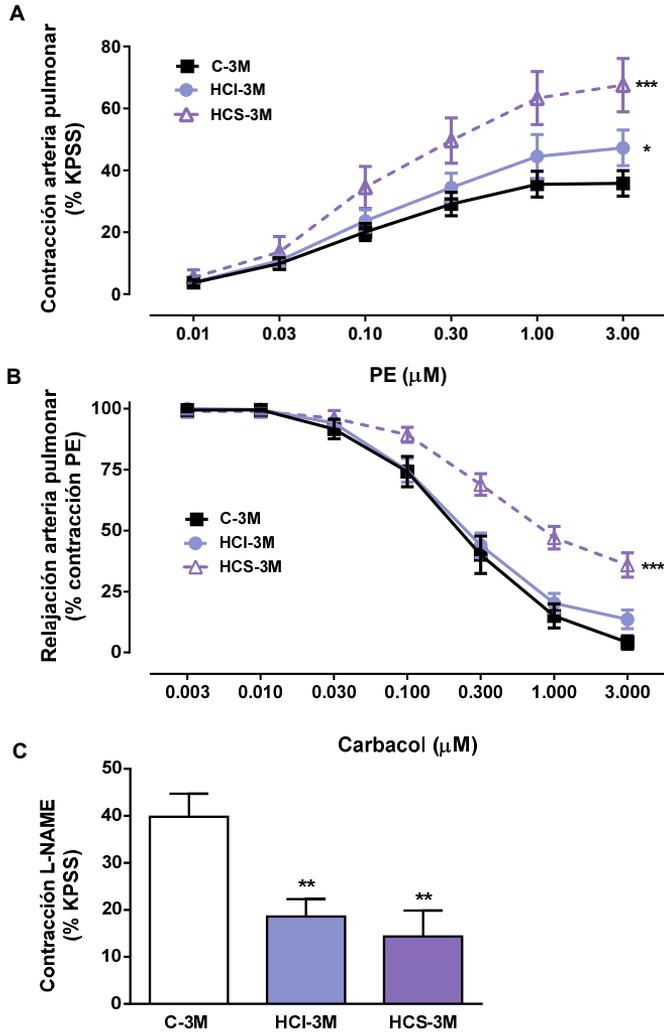


Figura 51. Respuestas vasculares de la arteria pulmonar de ratas jóvenes (3M): C, HCl e HCS. **A.** Dosis respuesta a fenilefrina (0.01-3 μ M), expresado como % de contracción a una solución salina fisiológica de 80mM de K⁺ (KPSS) * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. Curva C-3M (Two-way ANOVA). **B.** Dosis respuesta a carbacol (0.003-3 μ M), expresado como porcentaje de relajación en la arteria precontraída con fenilefrina (PE; submáxima) *** $p < 0.001$ vs. Curva C-3M (Two-way ANOVA). **C.** Respuesta vasoconstrictora a L-NAME 100 μ M, expresado como % de KPSS ** $p < 0.01$ vs. C-3M (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=7-11).

En la **figura 51C** se representa la contracción de la arteria pulmonar tras la aplicación del inhibidor de la eNOS, L-NAME 100 μ M, expresado como el % de la respuesta a una solución salina fisiológica 80mM de K⁺. Se observó una menor contracción al añadir el inhibidor en las arterias pulmonares de animales HCl e HCS frente a los controles (53% de reducción en HCl y 64% menor en HCS), en concreto los valores fueron de 40 \pm 5% en C, 19 \pm 4% en HCl (**p<0.01) y 14 \pm 5% en HCS (**p<0.01). Los resultados sugieren menor producción de NO en las arterias pulmonares HCl e HCS.

5.11.3 Morfología de la arteria pulmonar

En la **figura 52** se muestran dos cortes de una arteria pulmonar teñidos con tricrómico de Masson, correspondientes a una rata de 3 meses control y a una rata expuesta a HCl, realizados con el objetivo 20x. A pesar del cambio producido en la PAP de las ratas tras la HCl no se observaron diferencias en la morfología entre las dos arterias pulmonares. Se midió el grosor de las arterias pulmonares de animales controles y experimentales y se comprobó que el grosor de la pared vascular no fue modificado por la HCl. El resultado fue de 37 \pm 4 μ m en HCl-3M frente a 42 \pm 2 μ m en C-3M (p>0.05; n=3).

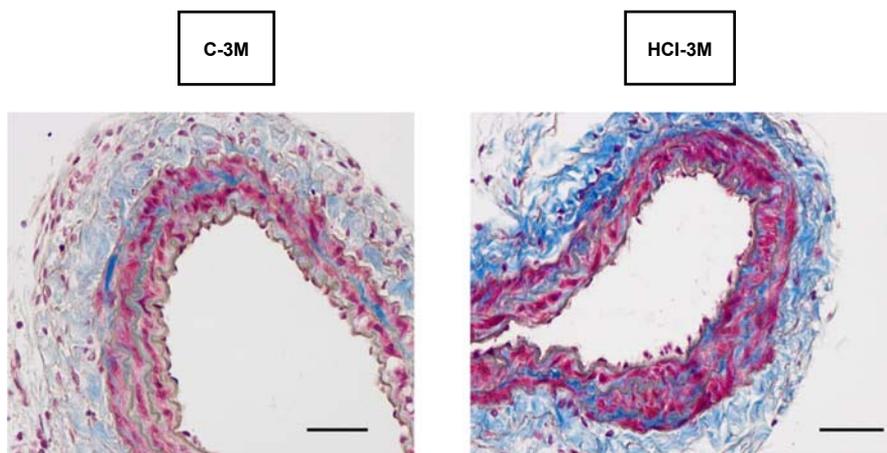


Figura 52. Morfología de la arteria pulmonar. Secciones de 5 μ m de una arteria pulmonar de una rata de 3 meses de edad, control (C-3M) e HCl (HCl-3M) teñidas con tricrómico de Masson. Imágenes realizadas con el objetivo 20x. Barra de calibración 50 μ m.

Capítulo II. El cobaya como modelo para el estudio de los efectos de la HCI

Como ya se ha señalado en la introducción, las observaciones clínicas y experimentales sugieren que una parte importante de los efectos de la HCI son debidos a la hiperactividad del cuerpo carotídeo. Por otro parte, se ha visto que el cobaya carece de respuesta ventilatoria a la hipoxia y que su CC es hipofuncional, lo que nos lleva a considerarlo un buen modelo para estudiar los efectos de la HCI mediados y no mediados por el CC. Por esta razón se han explorado, por primera vez, los efectos de la HCI en el cobaya.

5.12 Evolución y efecto de la HCI en el peso corporal

Se controló el peso de los cobayas C y expuestos a HCI, alimentados con dieta estándar propia de la especie y agua *ad libitum*, durante los 30 días de exposición a HCI. La **figura 53A** muestra la evolución del peso corporal durante el tiempo del tratamiento. Se observó un aumento de peso tanto en los cobayas C como en los cobayas HCI a partir del sexto día, probablemente debido al estrés del manejo y adaptación al ambiente menor en los cobayas en HCI. Sin embargo, las diferencias significativas en la ganancia de peso medio entre los cobayas C y los cobayas HCI comenzó en el noveno día (* $p < 0.05$), y permaneció hasta el final de la exposición a HCI donde la diferencia fue más acusada (** $p < 0.01$).

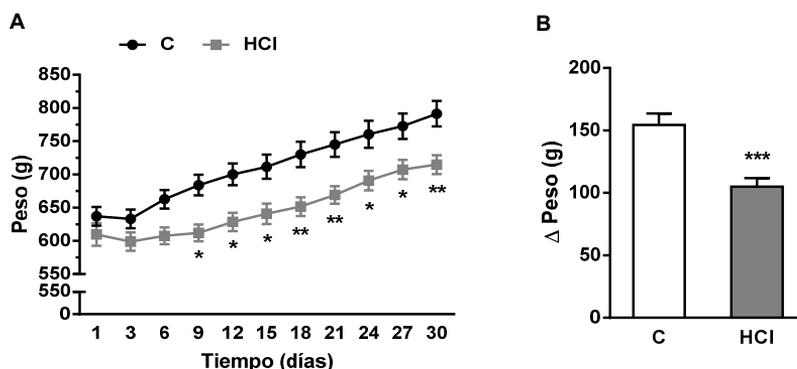


Figura 53. Peso corporal de los cobayas controles y expuestos a HCI. **A.** Evolución del peso de los cobayas C e HCI durante los 30 días de tratamiento. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. C (Two-way ANOVA). **B.** Incremento del peso medio de los cobayas después de 30 días de exposición a HCI. *** $p < 0.001$ vs. C (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM ($n=8$).

En la **figura 53B** se muestra el incremento de peso medio alcanzado por los animales durante los 30 días de la exposición a HCl. Los cobayas C incrementaron su peso medio en $155 \pm 9\text{g}$ mientras que los cobayas HCl el incremento fue de $105 \pm 7\text{g}$ (** $p < 0.001$).

5.13 Efecto de la HCl sobre distintos parámetros sanguíneos

La **tabla 7** muestra valores de PO_2 , PCO_2 , pH, HCO_3^- y St. HbO_2 obtenidos a partir de pequeñas muestras de sangre arterial, extraídas por cateterismo a través de la arteria carótida de cobayas C e HCl. Estas muestras fueron tomadas en dos condiciones: en normoxia (aire ambiente) o al final de un test de hipoxia aguda del 10% O_2 de 3 min. El test hipóxico produjo una disminución significativa de la PO_2 en los cobayas C e HCl llegando a valores de $29 \pm 3\text{mmHg}$ (### $p < 0.001$) y de $22 \pm 2\text{mmHg}$ (*** $p < 0.001$), respectivamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos a excepción de la menor St. HbO_2 obtenida al final del test de hipoxia aguda en los cobayas HCl con un valor de $44 \pm 6\%$ frente a $62 \pm 6\%$ en cobayas C (* $p < 0.05$). También se muestran los datos obtenidos de hematocrito que resultó idéntico en ambos grupos ($41.5 \pm 0.8\%$ en C frente a $41.4 \pm 0.8\%$ en HCl), mientras que los niveles de EPO aumentaron significativamente en los cobayas expuestos a HCl en comparación con los cobayas C. Los niveles de EPO fueron de $141 \pm 17\text{mU/mL}$ para los C y de 214 ± 52 para los HCl (* $p < 0.05$).

	C		HCl	
	21% O_2	10% O_2	21% O_2	10% O_2
PO_2 (mmHg)	65 ± 6	$29 \pm 3^{\text{###}}$	64 ± 6	$22 \pm 2^{\text{***}}$
PCO_2 (mmHg)	36 ± 2	32 ± 1	38 ± 3	36 ± 2
HCO_3^- (mM)	27 ± 1	26 ± 1	28 ± 1	27 ± 1
St. HbO_2 (%)	91 ± 2	$62 \pm 5^{\text{###}}$	90 ± 3	$44 \pm 6^{\text{***}}$
pH	7.49 ± 0.02	7.52 ± 0.01	7.47 ± 0.02	7.49 ± 0.01
Ht (%)	41.5 ± 0.8		41.4 ± 0.8	
EPO (mU/mL)	141 ± 17		$214 \pm 52^*$	

Tabla 7. Valores de gasometría, medidos en condiciones de normoxia (21% O_2) y al final de un test hipóxico (10% O_2) de 3 min, hematocrito (Ht) y niveles de eritropoyetina (EPO) en sangre arterial de cobayas C e HCl. ### $p < 0.001$ vs. 21% O_2 en C; *** $p < 0.001$ vs. 21% O_2 en HCl; * $p < 0.05$ vs. C (Two-way ANOVA). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=8).

5.14 Parámetros respiratorios y consumo de O₂

Se evaluó la ventilación pulmonar a través de pletismografía de cuerpo entero de los mismos animales en dos momentos diferentes, antes (HCl0) y después de la exposición a HCl (HCl30), mientras respiraban durante 10 minutos: aire (21%O₂), distintas intensidades de hipoxia (12%O₂, 10%O₂ y 7%O₂) e hipercapnia (5%CO₂). La respuesta ventilatoria se estudió mediante el registro continuo de la FR, el VC y el VM.

La **figura 54A** presenta registros respiratorios individuales obtenidos de un cobaya C y un cobaya HCl respirando cada una de las diferentes atmósferas (21, 10 y 7%O₂, y 5%CO₂). El trazado fue similar entre el C y el HCl respirando aire ambiente (21%O₂), pero se produjo un cambio al respirar en ambiente hipóxico más acusado cuando se trata del 7%O₂. Se observó un cambio importante al respirar hipercapnia sin apreciarse diferencias entre el C y el HCl.

En la **figura 54B** se muestra que la FR, expresada como respiraciones por minuto, no aumentó cuando los cobayas respiraron aire ambiente e hipoxia del 12%O₂ ni antes ni después de la exposición a HCl. Sin embargo, la frecuencia aumentó significativamente cuando los cobayas antes de ser expuestos a HCl (HCl0) respiraban 10%O₂ y 7%O₂ (#p<0.05, ###p<0.001, respectivamente). Se evaluó de igual manera tras la exposición a HCl (HCl30) observándose un aumento en la frecuencia a 10%O₂ y 7%O₂ (+++p<0.001).

El VC, expresado como mL/kg de peso, que se representa en la **figura 54C** no se modificó en ningún ambiente hipóxico medido en HCl0 e HCl30. Por otro lado, la mezcla hipercápnic (5%CO₂) produjo un aumento significativo de la FR y el VC en los animales antes y después de la exposición a HCl (###p<0.001, +++p<0.001, respectivamente).

En la **figura 55A** se muestra el VM, expresado como mL/min/kg de peso, obtenido del producto de la FR y el VC de los cobayas respirando las distintas mezclas de gases. La ventilación en normoxia, 12 y 10%O₂ no se vio afectada por la exposición a HCl. Sin embargo, se puede observar que el VM aumentó significativamente cuando los animales respiraron 7%O₂ en los dos momentos de medida, HCl0 e HCl30. Los animales tienen valores de VM de 397 ± 5mL/min/kg respirando aire (21%O₂) y 519 ± 19mL/min/kg respirando 7%O₂ antes de la exposición a HCl vs. 418 ± 10mL/min/kg respirando aire y 578 ± 25mL/min/kg respirando 7%O₂ después de la exposición a HCl (p<0.001). Además, el aumento del VM cuando los cobayas respiraron hipoxia del 7%O₂ fue significativamente mayor tras la exposición a HCl que en el momento inicial de medición en los mismos animales (**p<0.01). El test agudo de hipercapnia produjo un aumento significativo del VM muy similar en los cobayas HCl0 y HCl30. Los valores de VM fueron

1141 ± 45mL/min/kg frente a 1129 ± 43mL/min/kg para los cobayas antes y después de la HCl ($p < 0.001$).

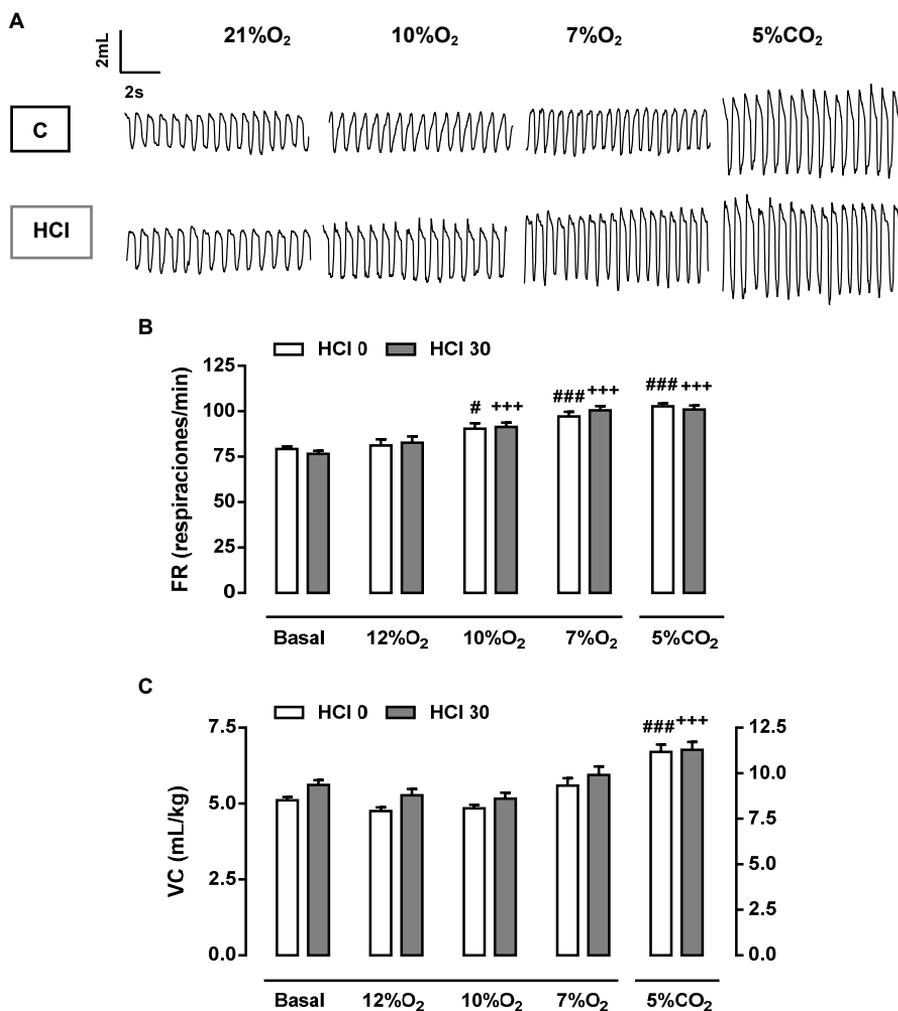


Figura 54. A. Muestra de registros pletismográficos de un cobaya C y un cobaya tras la exposición a HCl mientras respiran 21%O₂, 10%O₂, 7%O₂ y 5%CO₂. Barra de calibración 1cm horizontal 2 segundos y vertical 2mL. **B.** Frecuencia respiratoria (FR), expresada como respiraciones por minuto, y **C.** Volumen corriente (VC), expresado como mL/kg, de los cobayas a 0 días (HCl0) y después de 30 días de exposición a HCl (HCl30) en respuesta a test de hipoxia aguda (12%O₂, 10%O₂, 7%O₂) e hipercapnia (5%CO₂). # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs. Basal HCl0; +++ $p < 0.001$ vs. Basal HCl30 (One-way ANOVA). Los datos están expresados como la media ± SEM (n=16).

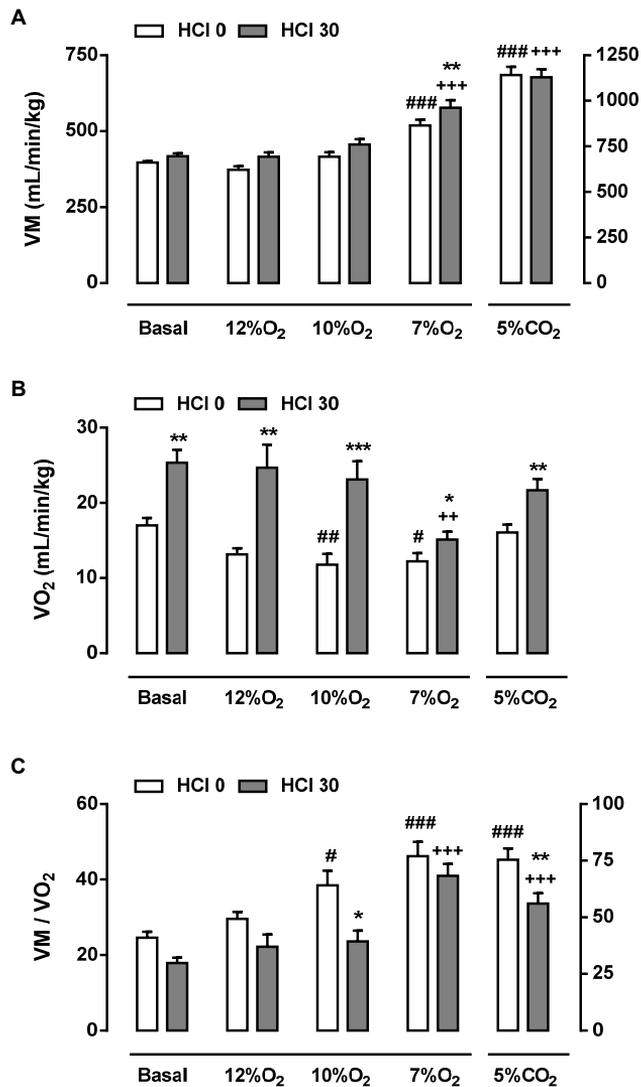


Figura 55. Pletismografía de cuerpo entero de cobayas C e HCl. **A.** Volumen minuto (VM), expresado como mL/min/kg, **B.** Consumo de O₂ (VO₂), expresado como mL/min/kg y **C.** Ventilación normalizada con el consumo de O₂ mediante el *ratio* VM/VO₂, en respuesta a test de hipoxia aguda (12%O₂, 10%O₂, 7%O₂) e hipercapnia (5%CO₂). #p<0.05, ###p<0.01, ####p<0.001 vs. Basal HCl0; ++p<0.01, +++p<0.001 vs. Basal HCl30 (One-way ANOVA); *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. HCl0 (Two-way ANOVA). Los datos están expresados como la media ± SEM (n=16).

La **figura 55B** representa el VO_2 , expresado como mL/min/kg, en las mismas condiciones descritas anteriormente. Se observó que los animales cuando respiran 10 y 7% O_2 antes de la exposición a HCl disminuyeron significativamente el metabolismo (17.1 ± 1.0 mL/min/kg respirando 21% O_2 vs. 11.8 ± 1.4 mL/min/kg respirando 10% O_2 y 12.2 ± 1.1 mL/min/kg respirando 7% O_2 ; $\#\#p < 0.01$, $\#p < 0.05$, respectivamente). Por el contrario, los cobayas tras la HCl aumentaron significativamente el VO_2 respirando 21, 12 y 10% O_2 , pero no al respirar atmósferas del 7% O_2 o 5% CO_2 , en las cuales no se observó diferencias entre los grupos.

También, se representa en la **figura 55C** los datos de ventilación normalizados con el metabolismo mediante el *ratio* VM/VO_2 , de manera que se pueda observar si se produce o no hiperventilación en las condiciones ya descritas. Se muestra que los animales en HCl0 hiperventilaron en hipoxia aguda del 10 y 7% O_2 ($\#\#p < 0.01$) y que los animales en HCl30 solo lo hicieron al 7% O_2 ($\#\#\#p < 0.001$). La mezcla hipercápnica produjo en ambas situaciones hiperventilación ($p < 0.001$). Sin embargo, la exposición a HCl eliminó la respuesta hiperventilatoria en hipoxia del 10% O_2 y parcialmente en hipercapnia ($*p < 0.05$, $**p < 0.01$, respectivamente).

Finalmente, se midió la respuesta ventilatoria al test Dejours (100% O_2 durante 3 min). Los datos no mostraron diferencias en el VM entre los cobayas antes y después de la exposición a HCl. Los valores obtenidos respirando aire ambiente menos los obtenidos respirando 100% O_2 fueron 57 ± 13 mL/min/kg y 74 ± 14 mL/min/kg antes y después de la exposición a HCl, respectivamente.

5.15 Respuesta del cuerpo carotídeo tras la exposición a HCl

Anteriormente se estudió la función del CC del cobaya a través de la activación del reflejo quimiorreceptor por su efecto sobre la función respiratoria. En este apartado se explora la funcionalidad del CC de los cobayas tras la exposición a HCl midiendo la actividad secretora de CA de las CQ frente al estímulo hipóxico.

5.15.1 Análisis morfológico e inmunocitoquímico

En primer lugar, se evaluó el peso de los CC y se observó que no había diferencias significativas entre C e HCl, con un valor de $81 \pm 4\mu\text{g}$ frente a $87 \pm 5\mu\text{g}$ ($n=8$), respectivamente. A continuación, se hizo un estudio morfológico comparativo entre CC de ambos grupos de cobayas.

En la **figura 56** se muestran dos superficies completas de una sección de $10\mu\text{m}$ de CC criopreservado C e HCl, ambos teñidos con hematoxilina eosina. Además, se observa una magnificación del parénquima de cada sección que se muestra a la derecha. En estas imágenes no se observaron diferencias sustanciales en la estructura del tejido.

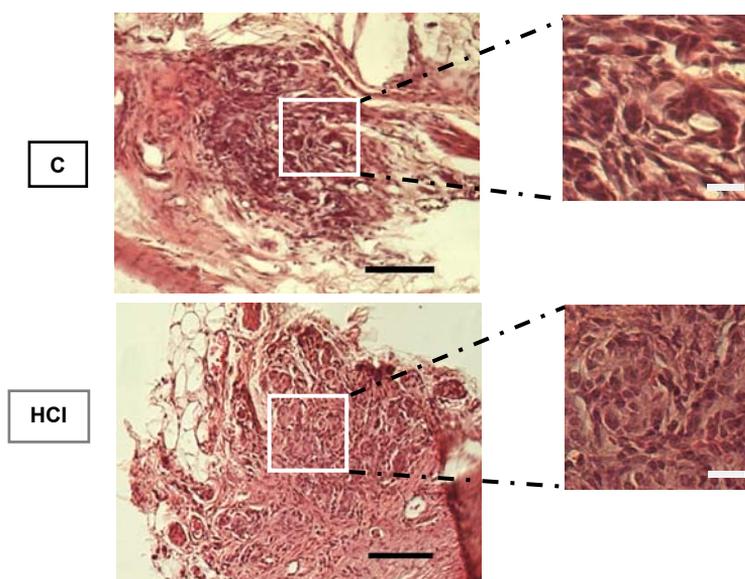


Figura 56. Morfología del cuerpo carotídeo (CC). Secciones de CC de cobaya C e HCl teñidas con hematoxilina y eosina. Barra de calibración $100\mu\text{m}$ y $20\mu\text{m}$ en las imágenes insertadas.

Tampoco hay diferencias entre C e HCl en la inmunotinción de TH en cortes de CC que se observan en la **figura 57A.**, aunque fue sorprendente la escasa presencia de células TH positivas. La **figura 57B** muestra un cultivo de CQ disociadas de CC de cobayas de cada grupo, C e HCl, e inmunoteñidas para TH. El porcentaje de CQ TH positivas fue del 7% en ambos casos determinado por recuento acumulado de varios cultivos de CC obtenidos de 2 cobayas de cada grupo, un porcentaje bajo que se correlaciona con lo observado en los experimentos histológicos.

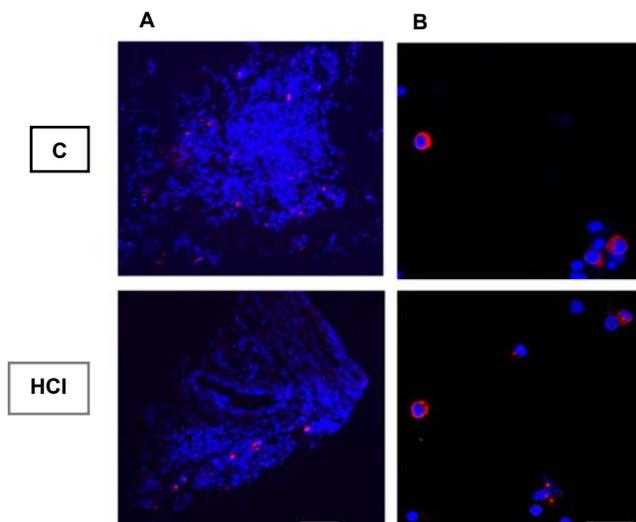


Figura 57. A. Identificación por inmunohistoquímica de CQ con tirosina hidroxilasa (TH; rojo) y tinción de núcleos con DAPI (azul) en secciones de CC de cobaya C e HCl. Barra de calibración 100µm. **B.** Inmunocitoquímica de células TH (rojo) y núcleos celulares con DAPI (azul) de CC disociados C e HCl. Barra de calibración 25µm.

5.15.2 Contenido de catecolaminas endógenas

En la **figura 58** se muestra el contenido endógeno de CA, expresado como pmol de NE o DA por CC, medido en CC de animales C y tras la exposición a HCl. El contenido de NE fue significativamente más alto en los cobayas HCl con un valor de 2.5 ± 0.2 pmol/CC frente a 0.8 ± 0.1 pmol/CC para los C (* $p < 0.05$) y aunque el contenido de DA fue ligeramente más alto en los cobayas HCl con un valor de 2.5 ± 0.6 pmol/CC frente a 1.6 ± 0.4 pmol/CC para los C, el aumento no fue significativo.

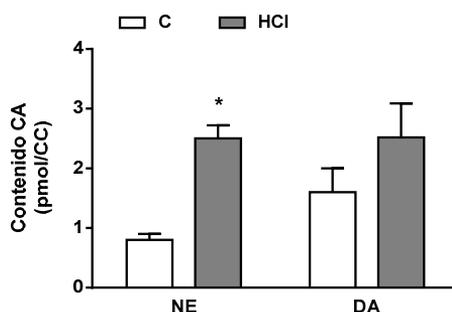


Figura 58. Contenido endógeno de norepinefrina (NE) y dopamina (DA) expresado como pmol/CC de cobayas C e HCl medido por HPLC-ED. * $p < 0.05$ HCl vs. C (Two-way ANOVA). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=8-12).

5.15.3 Respuesta secretora a la hipoxia y al alto K⁺

La **figura 59A** muestra el curso temporal de la secreción de ³H-CA en CC de cobayas controles y experimentales tras su marcaje con tirosina tritiada. Los datos mostraron que tanto en los CC controles como en los HCl no había aumento de ³H-CA en respuesta a la hipoxia (2%O₂) y que no existían diferencias en la respuesta a 60mM de K⁺ cuando comparamos los CC controles con los experimentales.

Se observó lo mismo en la **figura 59B**, en ella se representa la secreción evocada de ³H-CA, expresada como % de contenido, inducida por 2%O₂ y el alto K⁺, es decir, la secreción producida por los estímulos por encima de la secreción basal. A diferencia de la falta de respuesta al estímulo hipóxico, los CC de los cobayas C e HCl secretaron cantidades comparables de ³H-CA (7.1 ± 1.1% y 9.0 ± 0.9%, respectivamente) cuando fueron estimulados por 60mM de K⁺.

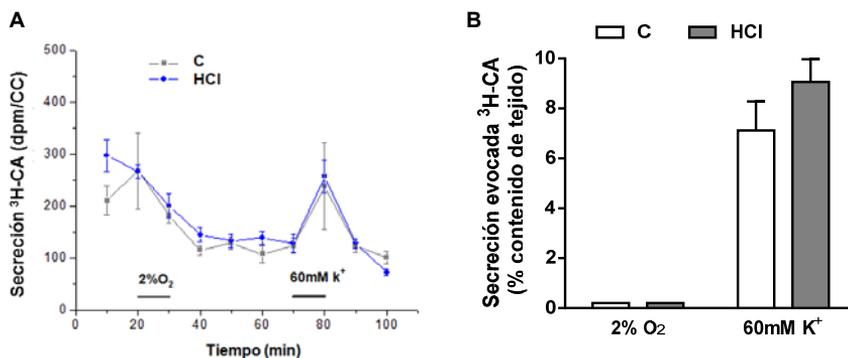


Figura 59. Efecto de la hipoxia y del alto K⁺ en la secreción de ³H-Catecolaminas (³H-CA). **A.** Curso temporal de la secreción de ³H-CA expresado como dpm/CC en situación basal y en respuesta a 2%O₂ y 60mM de K⁺ en CC controles (línea gris) e HCl (línea azul). **B.** Secreción evocada de ³H-CA, expresado como % del contenido de tejido de CC, en respuesta a 2%O₂ y 60mM de K⁺ en CC controles y tras la exposición a HCl. Los datos están expresados como la media ± SEM (n=6).

5.15.4 Medida de Ca²⁺ citosólico en células quimiorreceptoras

Para corroborar los datos obtenidos sobre la falta de respuesta a la hipoxia en CC de cobayas medida como secreción de ³H-CA, se estudió el nivel de Ca²⁺_c para los mismos estímulos en cultivos de células de CC disociados. En la **figura 60A** se muestra un registro representativo donde se observa la variación del Ca²⁺_c en respuesta a la hipoxia (gaseo con N₂) y a 35mM de K⁺. Los datos están expresados como el incremento del *ratio* entre la fluorescencia emitida por Fura-2-AM tras ser excitado a 340nm y a 380nm (*Ratio* 340/380nm). Finalmente, lo que se representa es la integración de las respuestas

obtenidas en los registros. Para ello las señales se desplazaron electrónicamente a cero (línea roja; **figura 60A**) y se integró el área bajo la curva respecto a esa basal, pudiendo medir el incremento del área correspondiente a cada estímulo y normalizarlo por el tiempo de aplicación del mismo (2 minutos para el N_2 y 1 minuto para el K^+).

En la **figura 60B** se representa la medida de Ca^{2+}_c en las CQ de CC controles y experimentales en condiciones basales y en respuesta a N_2 y 35mM de K^+ . Se puede observar cómo la hipoxia en cobayas C e HCl no modificó la señal de fluorescencia acumulada mientras que el alto K^+ , que fue aplicado durante la mitad de tiempo produjo un aumento similar en las células de ambos cultivos celulares, C e HCl.

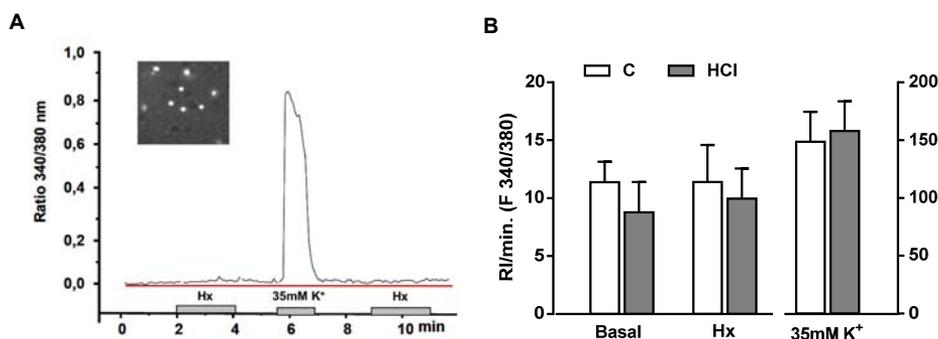


Figura 60. Efecto de la hipoxia y del K^+ en el Ca^{2+}_c . **A.** Registro de los niveles de Ca^{2+}_c en una CQ de CC control, empleando Fura-2-AM, expresado como el Ratio 340/380nm. La imagen insertada en la parte superior de la misma figura muestra células estimuladas con alto K^+ . **B.** Niveles de Ca^{2+}_c expresado como la respuesta integrada/min, en CQ de CC controles y tras la exposición de HCl en condiciones basales y en respuesta a hipoxia (5% CO_2 / 95% N_2) y 35mM de K^+ . Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=28-33).

5.16 Medida de la actividad simpática: parámetros relacionados

5.16.1 Contenido de catecolaminas endógenas en distintos tejidos

La falta de efecto de la exposición a HCl sobre la actividad del CC llevó a analizar el contenido de los niveles de CA en las terminaciones simpáticas de los siguientes tejidos: ganglio cervical superior (GCS), arteria renal (AR) y médula adrenal (MA), como un índice de la actividad simpática. Además, las terminaciones simpáticas y la MA son las principales fuentes (>80%) de NE y de E en plasma respectivamente, por lo tanto, los niveles de NE y E en plasma pueden representar un buen indicador del tono simpático generalizado.

Los resultados mostraron diferencias selectivas en el contenido de CA en los tejidos mencionados tras la exposición de los cobayas a HCl. Como se muestra en la **figura 61A**, el contenido de NE medido en GCS de cobayas HCl fue significativamente mayor al contenido de NE en GCS de cobayas C; los valores fueron de 74.8 ± 3.4 pmol/mg y 60.8 ± 2.3 pmol/mg ($***p < 0.001$), respectivamente. Sin embargo, el contenido de DA no se modificó tras la exposición a HCl, siendo los valores de 7.7 ± 0.5 pmol/mg en C y 11.8 ± 0.8 pmol/mg de GCS en el grupo de los cobayas HCl.

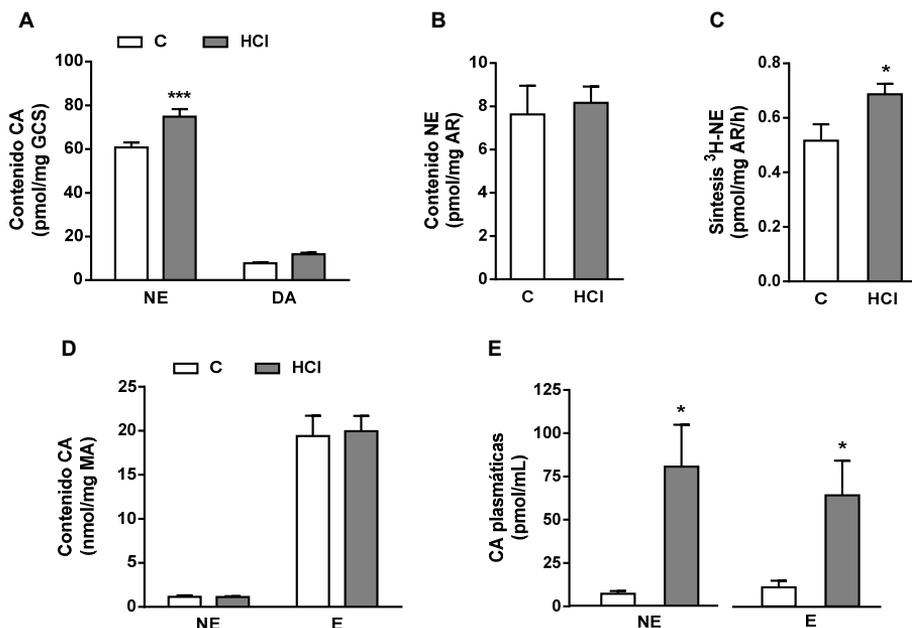


Figura 61. Efecto de la HCl en la actividad simpática. **A.** Contenido de norepinefrina (NE) y dopamina (DA) expresado como pmol/mg de tejido de ganglio cervical superior (GCS) de cobayas C e HCl medido por HPLC-ED. $***p < 0.001$ HCl vs. C (Two-way ANOVA) (n=14-16). **B.** Contenido y **C.** Síntesis de NE expresado como pmol/mg y como pmol/mg/h, respectivamente, de tejido de arteria renal (AR) de cobayas C e HCl. $*p < 0.05$ HCl vs. C (Unpaired t-test) (n=6-7). **D.** Contenido de NE y epinefrina (E) expresado como nmol/mg de tejido de médula adrenal (MA) de cobayas C e HCl (n=14-16). **E.** Contenido de NE y E expresado como pmol/mL de plasma de cobayas C e HCl. $*p < 0.05$ HCl vs. C (Unpaired t-test) (n=6-8). Los datos están expresados como la media \pm SEM.

No se observaron cambios en el contenido de CA endógenas medidos en AR y MA de cobayas C y tras la exposición a HCl. La **figura 61B** muestra el contenido similar de NE en AR de cobayas C e HCl, con un valor de 7.6 ± 1.3 pmol/mg frente a 8.2 ± 0.7 pmol/mg de tejido de AR, respectivamente. Sin embargo, la síntesis de ³H-NE fue significativamente mayor en la AR de cobayas HCl, como se puede observar en la **figura 61C**. La síntesis de ³H-NE fue de 0.52 ± 0.06 pmol/mg/h de tejido de AR en cobayas C

frente a 0.69 ± 0.04 pmol/mg/h de tejido de AR en cobayas HCl ($*p < 0.05$). El contenido CA de la MA también fue similar en ambos grupos (**Figura 61D**). A nivel plasmático se observó diferencias en el nivel de CA representado en la **figura 61E**. El nivel de NE plasmático fue significativamente más alto en los cobayas HCl que en los cobayas C con un valor de 80.7 ± 24.3 pmol/mL frente a 7.2 ± 1.7 pmol/mL ($*p < 0.05$), respectivamente. El nivel de E plasmático fue de 11 ± 4 pmol/mL en C y también fue significativamente más alto para los HCl que llegó a ser de 64 ± 20 pmol/mL ($*p < 0.05$).

5.16.2 Glucemia basal

Uno de los mecanismos que regula la concentración de glucosa en la sangre es la estimulación de la médula suprarrenal por fibras del sistema nervioso simpático, produciendo E y NE aumentando la concentración de glucosa. Por esta razón, se realizó este test en el animal en ayunas sin anestesiarse para conocer la glucemia basal de los animales C e HCl, cuyo resultado se muestra en la **figura 62**. Los niveles de glucosa en ayunas fueron significativamente más altos en HCl que en cobayas C con valores de 100 ± 5 mg/dL frente a 86 ± 2 mg/dL, respectivamente ($*p < 0.05$).

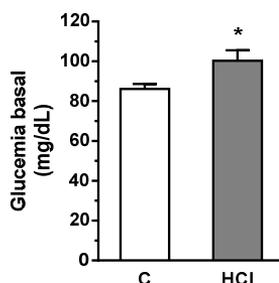


Figura 62. Niveles de glucemia basal, expresado como mg/dL, medidos en sangre de cobayas C e HCl en ayunas y sin anestesiarse. $*p < 0.05$ HCl vs C (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=16).

5.16.3 Secreción de catecolaminas endógenas de la médula adrenal

Los datos presentados en la **figura 61D** no muestran un comportamiento diferente de la MA, medido como contenido de CA, después de la exposición a HCl. Sin embargo, el aumento en los niveles plasmáticos de CA (**Figura 61E**) y la respuesta metabólica (**Figura 62**) en los cobayas HCl llevó a comprobar la posible sensibilidad directa a la hipoxia de las células cromafines de la MA. Para ello, estudiamos los efectos de la hipoxia ($2\%O_2$) en la secreción de CA de la MA *in vitro* de ambos grupos, C e HCl.

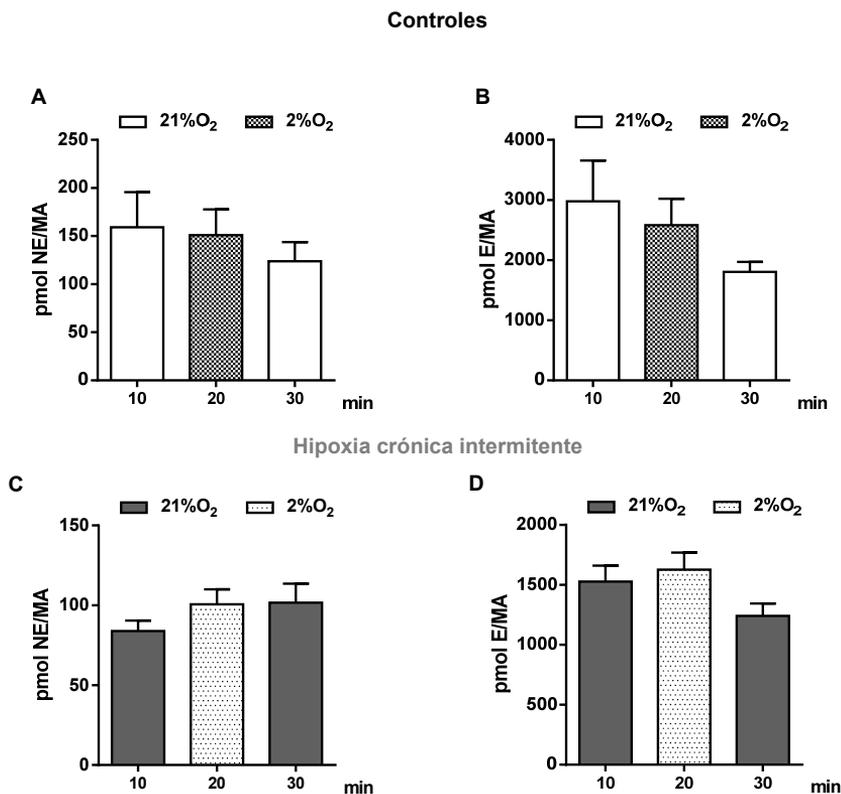


Figura 63. Secreción endógena de catecolaminas de la médula adrenal (MA) y efecto del estímulo hipóxico del 2%O₂. **A.** y **B.** Curso temporal de la secreción de norepinefrina (NE) y epinefrina (E), respectivamente, de MA de cobayas controles. **C.** y **D.** Curso temporal de la secreción de NE y E, respectivamente, de MA de cobayas expuestas a HCl. Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=4-16).

Los resultados presentados en la **figura 63** muestran que la hipoxia no indujo secreción de CA, es decir, no alteró el curso temporal de la salida de CA por la MA en ninguno de los grupos. En condiciones normóxicas (21%O₂), la cantidad de E en la solución de incubación fue de 2979 ± 678 pmol/MA y en hipoxia (2%O₂) la secreción de E fue de 2583 ± 439 pmol/MA en cobayas C. Los niveles de NE fueron 159 ± 36 pmol/MA en normoxia y 151 ± 26 pmol/MA en hipoxia en el mismo grupo. Mediante un análisis en paralelo, la cantidad de E secretada por la MA de cobayas HCl fue de 1527 ± 133 pmol/MA en 21%O₂ y 1628 ± 140 pmol/MA en 2%O₂. Los valores de NE fueron 84 ± 6 pmol/MA y 100 ± 9 pmol/MA en normoxia e hipoxia, respectivamente, en MA de cobayas tras la exposición a HCl. Los datos concluyen que la HCl no proporciona sensibilidad intrínseca a la hipoxia en la MA del cobaya.

5.17 Actividad cardiovascular tras la exposición a HCl

5.17.1 Efecto sobre la presión arterial sistémica

Como cabría esperar por el aumento en los niveles plasmáticos de CA (**Figura 61E**), se observó que la PAS de cobayas anestesiados también aumenta en el grupo experimental expuesto a HCl, aunque el efecto no fue muy notable. La PAS en cobayas HCl fue de 45 ± 3 mmHg y de 37 ± 2 mmHg en cobayas C (* $p < 0.05$; **figura 64A**). En la **figura 64B** se representa la presión arterial sistólica y diastólica obtenidas de animales respirando aire, hipoxia aguda ($10\%O_2$) y de nuevo aire que muestra su recuperación. Los datos registrados de las presiones sistólicas y diastólicas fueron similares en ambos grupos de animales, aunque con una tendencia a ser más altos en los cobayas HCl. En concreto, en los cobayas C la presión sistólica fue de 47 ± 1 mmHg y 46 ± 2 mmHg y en los cobayas HCl fue de 53 ± 3 mmHg y 51 ± 4 mmHg en aire y $10\%O_2$, respectivamente. Para la presión diastólica los valores fueron de 31 ± 2 mmHg y 22 ± 1 mmHg en el grupo C y 36 ± 3 mmHg y 24 ± 1 mmHg en los HCl, en aire y $10\%O_2$, respectivamente. No se produjo cambio en la presión del pulso.

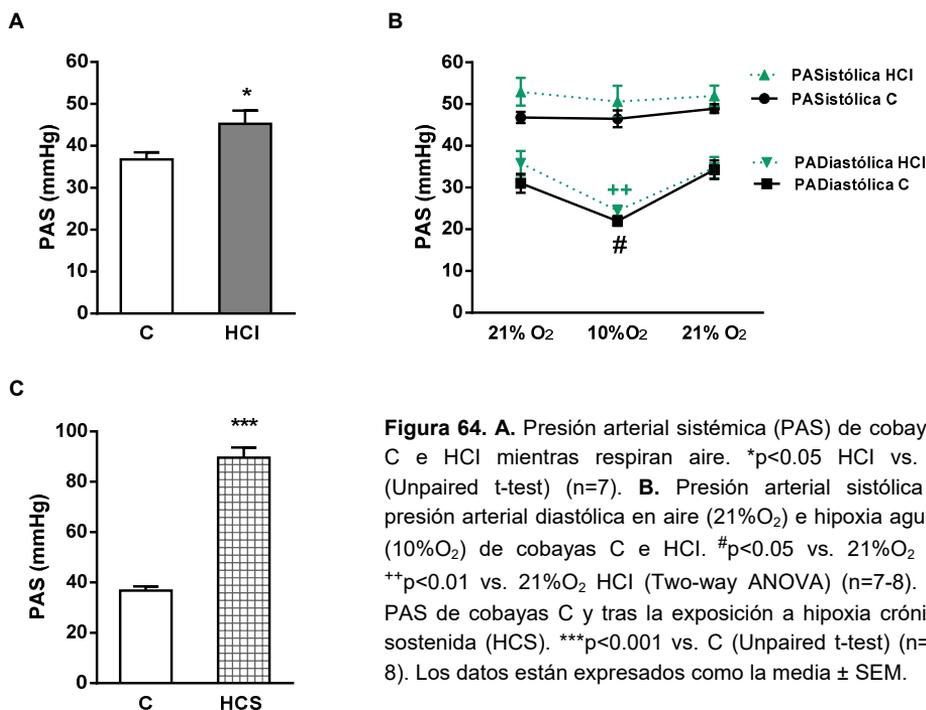


Figura 64. **A.** Presión arterial sistémica (PAS) de cobayas C e HCl mientras respiran aire. * $p < 0.05$ HCl vs. C (Unpaired t-test) ($n=7$). **B.** Presión arterial sistólica y presión arterial diastólica en aire ($21\%O_2$) e hipoxia aguda ($10\%O_2$) de cobayas C e HCl. # $p < 0.05$ vs. $21\%O_2$ C; ++ $p < 0.01$ vs. $21\%O_2$ HCl (Two-way ANOVA) ($n=7-8$). **C.** PAS de cobayas C y tras la exposición a hipoxia crónica sostenida (HCS). *** $p < 0.001$ vs. C (Unpaired t-test) ($n=5-8$). Los datos están expresados como la media \pm SEM.

Dado que el hábitat original de los cobayas es el antiplano, con una presión atmosférica baja, y por tanto una PO_2 reducida, se realizó una maniobra alternativa que consistió en la medida de la PAS tras la exposición a HCS. Como se muestra en la **figura 64C** la PAS de cobayas en HCS fue muy superior a la de los cobayas C e HCl, llegando a un valor de 89.7 ± 4 mmHg ($***p < 0.001$), prácticamente el doble de la PAS de los cobayas controles, y un valor similar al de otros roedores en condiciones basales.

5.17.2 Frecuencia cardíaca e Índice de Fulton

La **figura 65A** muestra el aumento significativo de la frecuencia cardíaca (FC) en cobayas HCl con un valor de 245 ± 5 latidos por minuto ($***p < 0.001$) frente a 195 ± 3 latidos por minuto en los cobayas C. Por otro lado, no se observaron diferencias en el peso del corazón, del VD, ni del VI+septum entre las cobayas C e HCl (**Figura 65B**). Al igual que en los cobayas HCl, los cobayas HCS presentaron un aumento significativo de FC con un valor de 257 ± 17 ($***p < 0.001$). Respecto al Índice de Fulton (**Figura 65C**) se observó que la HCl no lo modificó, pero sí lo hizo la HCS, es decir, los cobayas con HCS presentaron hipertrofia del ventrículo derecho que no fue apreciable en los cobayas tras la exposición a HCl.

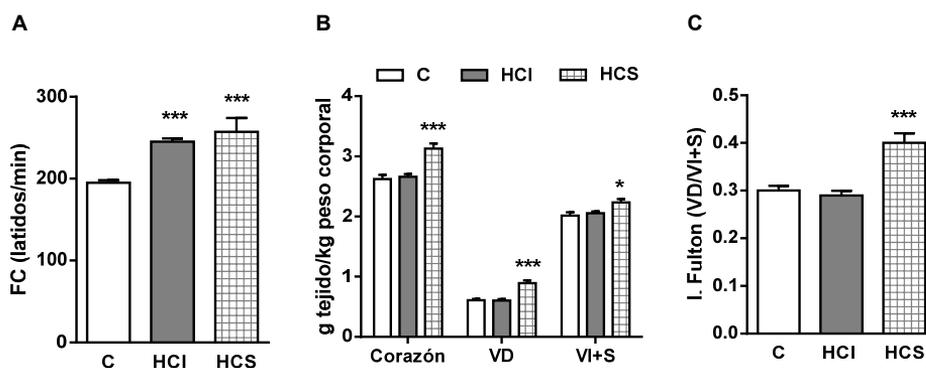


Figura 65. **A.** Frecuencia cardíaca (FC), expresada como latidos por minuto, de cobayas C, HCl e HCS mientras respiran aire ($21\%O_2$). $***p < 0.001$ vs. C (One-way ANOVA). **B.** Peso del corazón, ventrículo derecho (VD) y ventrículo izquierdo más septum (VI + S) en relación con el peso corporal, expresado como g de tejido/kg de peso corporal, de los cobayas C, HCl e HCS. $*p < 0.05$, $***p < 0.001$ vs. C (Two-way ANOVA). **C.** Índice de Fulton, determinado a través del VD entre VI+S de los cobayas C, HCl e HCS. $***p < 0.001$ vs C (One-way ANOVA). Los datos están expresados como la media \pm SEM ($n=6-7$).

5.18 Efecto sobre la vasoconstricción pulmonar hipóxica

Los cambios importantes en la PAS y en la FC tras la HCl y la HCS llevaron a evaluar el comportamiento de la presión arterial pulmonar (PAP). La falta de sensibilidad al O₂ del CC de cobaya, C e HCl, llevó a evaluar la VPH. La **figura 66** muestra los resultados obtenidos de PAP medida respirando aire y al final de un test hipóxico del 10%O₂ durante 3 minutos para estudiar la VPH. Se observa en la **figura 66A** que la PAP fue similar en las cobayas C e HCl, es decir, la HCl no produjo cambios en la PAP en las cobayas, con valores de 10.1 ± 0.4 mmHg para los C y 10.8 ± 0.8 mmHg para los HCl.

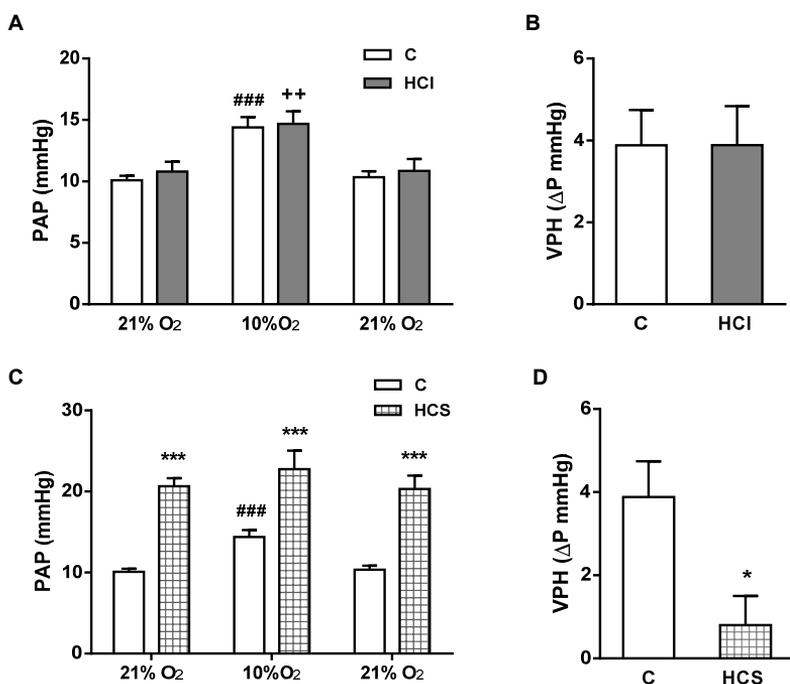


Figura 66. Presión arterial pulmonar (PAP) y respuesta de la vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH). **A.** PAP de cobayas C e HCl mientras respiran aire (21%O₂) e hipoxia aguda (10%O₂). ###p<0.001 vs. 21%O₂ C; ++p<0.01 vs. 21%O₂ HCl (Two-way ANOVA) (n=7). **B.** Respuesta VPH en cobayas C e HCl. **C.** PAP de cobayas C y tras la exposición a HCS mientras respiran aire (21%O₂) e hipoxia aguda (10%O₂). ###p<0.001 vs. 21%O₂ C; ***p<0.001 vs. C; #p<0.05 vs. 21%O₂ C (Two-way ANOVA) (n=5-7). **D.** VPH de cobayas C e HCS. *p<0.05 vs. C (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media ± SEM.

Cuando realizamos el test de hipoxia aguda se observó que tanto los C como los HCl mantuvieron la VPH lo que indicó que las arterias pulmonares de ambos grupos fueron sensibles a la hipoxia. Sin embargo, no hubo diferencias entre los C y los HCl con un aumento en la presión pulmonar prácticamente idéntico, de 3.9 ± 0.9 mmHg y $3.9 \pm$

1.0mmHg, respectivamente (**Figura 66B**). Lo contrario ocurrió en los cobayas en HCS. En primer lugar, se encontró que la PAP fue significativamente superior a la registrada en los C, como se muestra en la **figura 66C**, llegando a valores de $20.6 \pm 1.0\text{mmHg}$ ($***p<0.001$). En segundo lugar, la VPH prácticamente se perdió en los cobayas que fueron expuestos a HCS. La **figura 66D** muestra una VPH disminuida en los cobayas HCS con un aumento de presión arterial de $0.8 \pm 0.7\text{mmHg}$ ($*p<0.05$) resultado significativamente diferente al valor control.

En definitiva, en el cobaya la HCI aumentó la PAS y la FC sin modificar el Índice de Fulton ni la VPH. Por otro lado, la HCS produjo una PAP elevada, un aumento de FC y una pérdida de la VPH.

5.19 Respuestas vasculares tras la exposición a HCI

Teniendo en cuenta los datos mostrados de PAS y PAP en los tres grupos de cobayas estudiados y con objeto de compararlos con los datos obtenidos en rata, el siguiente paso fue analizar la función vascular, en términos de contracción y relajación en una arteria sistémica (arteria carótida) y en la arteria pulmonar. Del mismo modo, se evaluó el papel del NO, un importante vasodilatador, a través del bloqueo con el inhibidor competitivo de la NOS denominado L-NAME (N(omega)-nitro-L-arginine-methyl ester). Este estudio se realizó mediante la técnica de miografía de alambre.

5.19.1 Arteria carótida

La **figura 67** muestra la respuesta vascular contráctil de la arteria carótida de cobayas C, HCI e HCS, y el efecto del inhibidor de la eNOS (L-NAME) en la misma. En la **figura 67A** se representa la respuesta a dosis acumulativas de fenilefrina (PE; $0.1\text{-}30\mu\text{M}$) y se observa en línea continua que las propiedades contráctiles en la arteria carótida fueron idénticas en los tres grupos a las dosis de PE estudiadas. La contracción comenzó al añadir $1\mu\text{M}$ de PE produciendo escasa contracción incluso a dosis muy elevadas. En la misma figura, pero en trazado discontinuo, se muestra el efecto del inhibidor L-NAME sobre la eNOS en la respuesta a distintas dosis de PE. Se observó una mayor contracción debida a la eliminación de NO a medida que la dosis de PE aumentó. Analizando la respuesta contráctil a la dosis más alta de PE ($30\mu\text{M}$) en la arteria carótida (**Figura 67B**) se comprobó que las arterias procedentes de los cobayas C e HCI tuvieron un comportamiento similar, $22.7 \pm 1.9\%$ y $19.9 \pm 1.4\%$, respectivamente, y aunque no fue significativo las arterias carótidas de cobayas HCS mostraron una

tendencia a una contracción mayor, $28.4 \pm 3.0\%$. El efecto del L-NAME en la contracción a la dosis más alta de PE produjo un aumento muy significativo en la contracción a PE llegando a niveles de contracción del $62.72 \pm 4.4\%$, $65.1 \pm 7\%$ y $58.5 \pm 5.2\%$ ($***p < 0.001$) en arterias C, HCl e HCS, respectivamente.

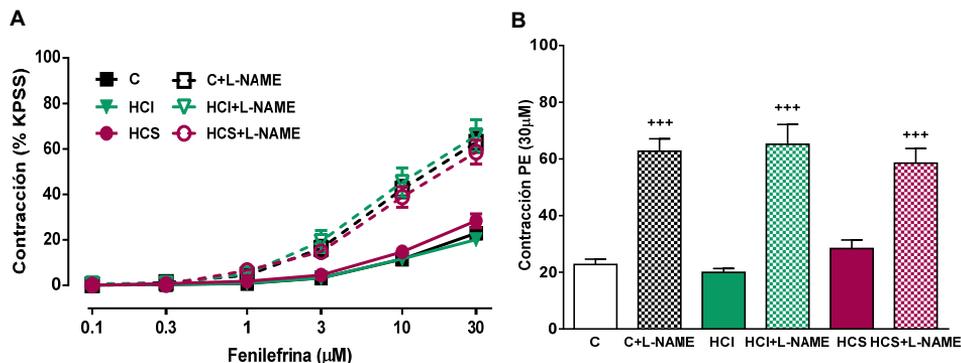


Figura 67. Función vasoconstrictora y efecto del inhibidor de la eNOS (L-NAME; $100\mu\text{M}$) en la arteria carótida de cobayas C, HCl e HCS. **A.** Dosis respuesta a fenilefrina (PE; $0.1\text{-}30\mu\text{M}$) y **B.** Respuesta constrictora a la dosis máxima de PE, expresado como porcentaje de la respuesta a una solución fisiológica de 80mM de K^+ (KPSS). $***p < 0.001$ vs. C, HCl e HCS (One-way ANOVA). Los datos están expresados como la media \pm SEM ($n=8\text{-}19$).

Cuando se estudió la relajación dosis respuesta a carbacol ($0.01\text{-}10\mu\text{M}$), expresado como porcentaje de relajación en la artera precontraída (PE; $30\mu\text{M}$) (**Figura 68A**), se encontró que las arterias carótidas procedentes de cobayas HCl (línea continua verde) se comportaron igual que los controles (línea continua negra) pero en el caso de las procedentes de cobayas HCS (línea continua granate) la relajación a carbacol fue menor a medida que la dosis aumentó. También se determinó el efecto del L-NAME en la relajación, es decir, como afecta la eliminación del NO endotelial en la relajación a carbacol. Se muestra en la **figura 68A**, en línea discontinua para los tres grupos de arterias. Al igual que se observó una mayor contracción a PE por eliminación de NO con L-NAME, se observó una menor relajación a carbacol y prácticamente pérdida en las arterias procedentes de los cobayas HCS a las dosis de carbacol estudiadas.

La **figura 68B** representa el porcentaje de relajación a la dosis más alta de carbacol, $10\mu\text{M}$. La relajación de las arterias carótidas de cobayas C e HCl fue similar, $77.1 \pm 2.0\%$ y $79.9 \pm 1.4\%$, respectivamente. Sin embargo, fue significativa la pérdida de relajación en las arterias HCS con un valor de $43.2 \pm 12.5\%$ ($***p < 0.001$). El patrón se reprodujo con L-NAME en C e HCl, $37.0 \pm 4.4\%$ y $34.2 \pm 7.0\%$ ($***p < 0.001$), respectivamente. También fue significativa la disminución en la relajación de las arterias HCS por efecto del L-NAME. El porcentaje de relajación fue de $13.6 \pm 5.8\%$ ($**p < 0.01$).

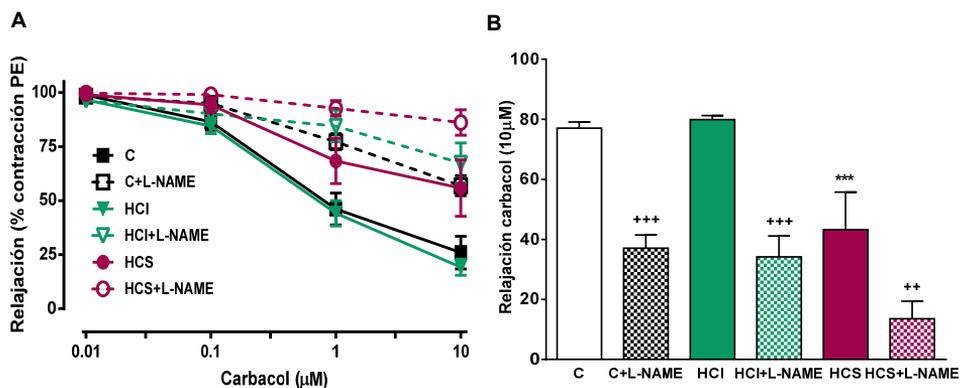


Figura 68. Función vasodilatadora y efecto del inhibidor de la eNOS (L-NAME; 100µM) en la arteria carótida de cobayas C, HCl e HCS. **A.** Dosis respuesta a carbaccol (0.01-10µM), expresado como porcentaje de relajación en la arteria precontraída con PE (30µM). **B.** Respuesta vasodilatadora a la dosis máxima de carbaccol (10µM), expresado como porcentaje de relajación en la arteria precontraída. ⁺⁺⁺p<0.001 vs. C e HCl; ^{**}p<0.01 vs. HCS; ^{***}p<0.001 vs. C (One-way ANOVA). Los datos están expresados como la media ± SEM (n=8-19).

5.19.2 Arteria pulmonar

La **figura 69** muestra la respuesta vascular contráctil de la arteria pulmonar de cobayas C, HCl e HCS, y el papel del NO. En la **figura 69A** se representa la respuesta a dosis acumulativas de PE (0.1-30µM) y se observa en línea continua que las arterias pulmonares se comportaron de manera similar en los tres grupos a las dosis de PE estudiadas, pero su contractilidad fue mayor que la correspondiente a las arterias carótidas de los mismos grupos (**Figura 67A**). En trazado discontinuo se muestra el efecto que tiene el inhibidor L-NAME sobre la eNOS en la respuesta a distintas dosis de PE. Se observó una mayor contracción por la eliminación de NO que fue más evidente en las arterias pulmonares de cobayas HCS.

Al analizar la respuesta contráctil a la dosis más alta de PE (30µM) en la arteria pulmonar (**Figura 69B**) se comprobó que las arterias pulmonares de los tres grupos se comportaron de manera similar sin cambios significativos; los valores fueron de 73.9 ± 9.4% para C, 61.6 ± 11.7% para HCl y 79.8 ± 15.9% para HCS. El efecto del L-NAME en la contracción a la dosis más alta de PE no produjo cambios significativos en las arterias pulmonares C e HCl con una contracción del 96.9 ± 8.1% y 74.0 ± 11.6%, respectivamente. Sin embargo, si se produjo un aumento significativo de la contracción en arterias pulmonares HCS tras la inhibición de eNOS, llegando a un valor de 135.7 ± 16.2% (*p<0.05).

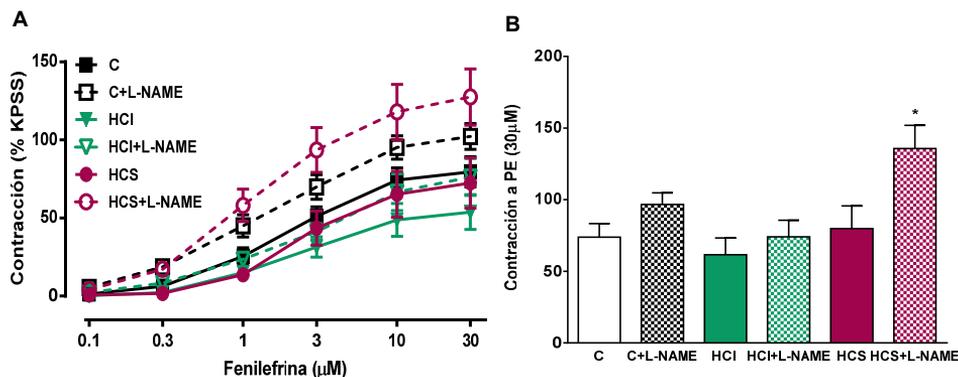


Figura 69. Función vasoconstrictora y efecto del inhibidor de la eNOS (L-NAME; 100µM) en la arteria pulmonar de cobayas C, HCl e HCS. **A.** Dosis respuesta a fenilefrina (PE 0.1-30µM) y **B.** Respuesta constrictora a la dosis máxima de PE, expresado como porcentaje de la respuesta a una solución salina fisiológica de 80mM de K⁺ (KPSS). **p*<0.05 vs. HCS (One-way ANOVA). Los datos están expresados como la media ± SEM (n=9-15).

Al igual que en la arteria carótida se analizó la relación dosis dependiente a carbacol (0.01-10µM) en la arteria pulmonar, expresado como porcentaje de relajación en la arteria precontraída con PE (30µM), como se muestra en la **figura 70A**. Se encontró que las arterias pulmonares procedentes de cobayas C e HCl (líneas continuas negra y verde, respectivamente) tenían una respuesta vasodilatadora parecida, la cual se alejaba de la respuesta vasodilatadora de la arteria pulmonar de cobayas HCS (línea continua granate) muy disminuida. En la misma figura, representado en línea discontinua, se observa el efecto del L-NAME en la relajación a distintas dosis de carbacol. La falta de NO produjo pérdida de relajación en los tres grupos de arterias estudiadas siendo más acusado en los C que en los HCl, perdiéndose prácticamente la respuesta vasodilatadora en los HCS.

La **figura 70B** representa el porcentaje de relajación a la dosis más alta de carbacol, 10µM. A esta dosis la relajación de las arterias pulmonares de cobayas C e HCl no mostró cambios significativos llegando a ser de $38.8 \pm 4.9\%$ y $50.9 \pm 4.6\%$, respectivamente. Sin embargo, sí fue significativo la pérdida de relajación en las arterias HCS con un valor de $18.1 \pm 4.4\%$ (**p*<0.05). La aplicación de L-NAME produjo una disminución significativa de la relajación en las arterias pulmonares C e HCl, que en número correspondió a $9.3 \pm 4.0\%$ y $18.2 \pm 7.0\%$ (+++*p*<0.001), respectivamente. Aunque no llegó a ser estadísticamente significativo el efecto del L-NAME en las arterias pulmonares HCS produjo una disminución drástica de la relajación de las mismas con un valor de $2.7 \pm 1.0\%$.

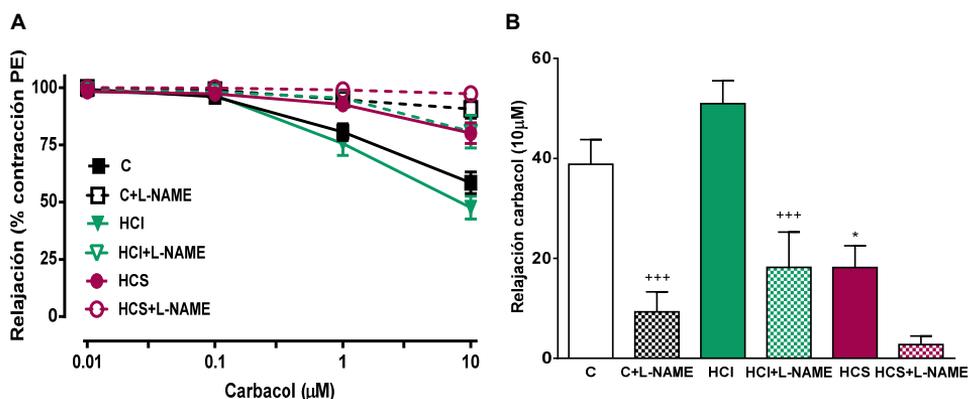


Figura 70. Función vasodilatadora y efecto del inhibidor de la eNOS (L-NAME; 100µM) en la arteria pulmonar de cobayas C, HCl e HCS. **A.** Dosis respuesta a carbacil (0.01-10µM), expresado como porcentaje de relajación en la arteria precontraída con PE (30µM). **B.** Respuesta vasodilatadora a la dosis máxima de carbacil (10µM), expresado como porcentaje de relajación en la arteria precontraída con PE. ⁺⁺⁺p<0.001 L-NAME vs. C e HCl; ^{*}p<0.05 HCS vs. C (One-way ANOVA). Los datos están expresados como la media ± SEM (n=9-15).

En definitiva, estos resultados indican que la HCl no modificó las propiedades vasculares en el cobaya pero que en animales HCS tanto la arteria carótida como la pulmonar presentan algún grado de disfunción endotelial.

5.20 Morfología de la arteria carótida y pulmonar tras la HCl

Para el estudio de la morfología de las arterias carótidas y pulmonares de los cobayas C y expuestos a HCl, se realizó la tinción tricrómica de Masson en secciones de arteria de 5µm de grosor. Como se ha mencionado en el capítulo anterior de resultados, la tinción del tricrómico de Masson muestra los núcleos en morado oscuro, el músculo en rosa y las fibras de colágeno en general en verdeazulado. La **figura 71** muestra una imagen de una arteria carótida C y una HCl, realizada con el objetivo 4x, con una zona ampliada a la derecha de la misma, tomada con el objetivo 10x. Morfológicamente no se observaron diferencias entre ambas arterias. Para comprobar que la HCl no alteró la pared vascular ni la luz del vaso, se realizaron medidas en 5 cortes de una arteria carótida de cada animal de un total de 6 animales controles y 6 animales tras la exposición a HCl. Los resultados se muestran en la **figura 72**. El grosor de la pared vascular determinado fue similar en C e HCl, al igual que el área de la luz del vaso medido en las mismas arterias. De modo que la HCl no afectó a las características morfológicas propias de la arteria carótida de los cobayas.

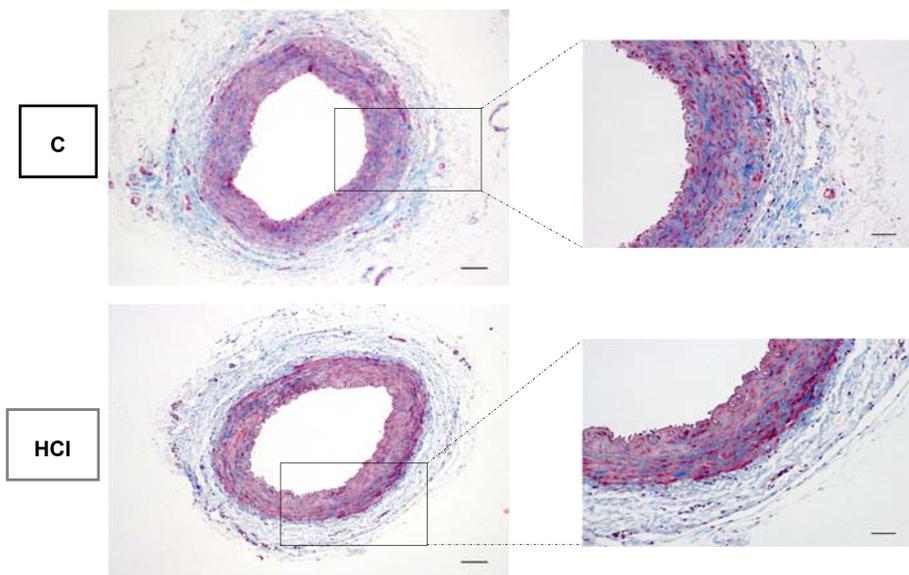


Figura 71. Morfología de la arteria carótida. Secciones de $5\mu\text{m}$ de una arteria C y una HCl teñidas con tricrómico de Masson. A la izquierda la imagen realizada con el objetivo 4x. Barra de calibración $100\mu\text{m}$. A la derecha amplitud de una zona con el objetivo 10x. Barra de calibración $50\mu\text{m}$.

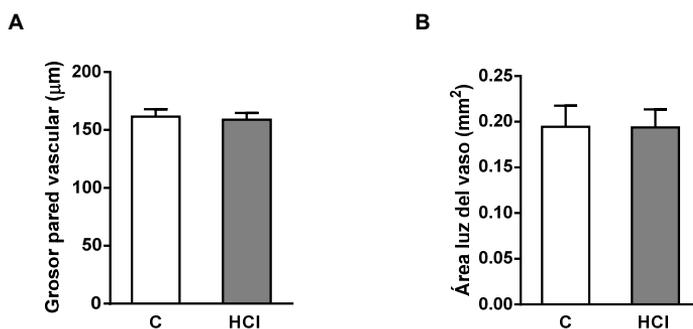


Figura 72. A. Grosor de la pared vascular, expresado en μm , y **B.** Área de la luz del vaso, expresado en mm^2 , de arterias carótidas de animales C e HCl. Los datos están expresados como la media \pm SEM ($n=6$).

También se estudió la morfología de la arteria pulmonar. En la **figura 73** se muestran dos cortes de una arteria pulmonar, correspondientes a un cobaya C y un cobaya expuesto a HCl, realizados con el objetivo 4x, con una zona ampliada a la derecha de la misma, tomada con el objetivo 20x. Al igual que en la arteria carótida, no se observaron diferencias en la morfología entre las dos arterias pulmonares. La **figura 74** muestra que la HCl no alteró el grosor de la pared vascular y tampoco modificó la luz del vaso.

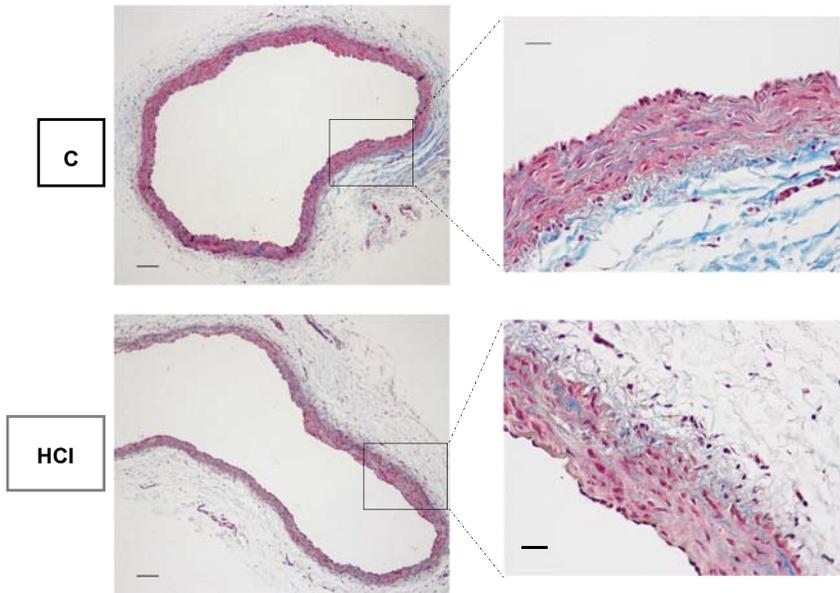


Figura 73. Morfología de la arteria pulmonar. Secciones de 5µm de una arteria C y una HCl teñidas con tricrómico de Masson. A la izquierda la imagen realizada con el objetivo 4x. Barra de calibración 100 µm. A la derecha amplitud de una zona con el objetivo 20x. Barra de calibración 25µm.

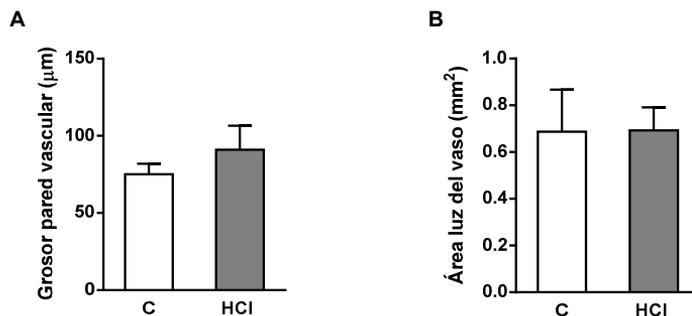


Figura 74. A. Grosor de la pared vascular, expresado en µm, y **B.** Área de la luz del vaso, expresado en mm², de arterias pulmonares de animales C e HCl. Los datos están expresados como la media ± SEM (n=4).

5.21 Factores vasoactivos en la regulación de la presión arterial

Debido a la hipotensión que presenta el cobaya y al aumento de presión inducido por la HCl, se analizaron algunos factores vasoactivos a nivel plasmático para conocer las sustancias que afectan activamente al endotelio de los vasos de los cobayas y del efecto que la HCl tiene sobre ellos. En primer lugar, se valoró la biodisponibilidad del NO a través de la cuantificación de nitritos, metabolito del NO, y de arginina, precursor natural

del NO, y sus metabolitos. Además, se cuantificaron los niveles de factores endoteliales, como la ET-1, y de factores humorales, como la AII y el ANP. Alguno de estos mediadores también se estudió en el plasma de cobayas tras la exposición a HCS.

5.21.1 Factores endoteliales: NO, ET-1 y VEGF

Para conocer la disponibilidad de **óxido nítrico** después de la exposición a HCl en los cobayas, se midieron los niveles plasmáticos de **nitritos** como un índice de la producción de NO vascular. Como muestra la **figura 75**, la concentración de nitritos, en μM , en el plasma de cobayas HCl fue significativamente mayor que el encontrado en el plasma de cobayas C. La concentración de nitritos prácticamente se duplicó tras la exposición a HCl. Los valores fueron de $36.8 \pm 4.2\mu\text{M}$ en C y $68.7 \pm 14.0\mu\text{M}$ en HCl ($*p < 0.05$ vs. C).

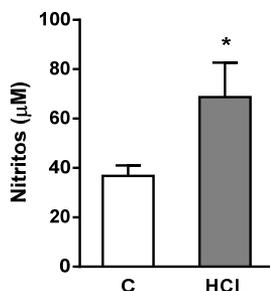


Figura 75. Nivel de nitritos en plasma de cobayas C e HCl, expresado en μM . $*p < 0.05$ vs. C (Unpaired t-test). Los datos están expresados como la media \pm SEM (n=6-8).

Los inhibidores endógenos de la eNOS pueden reducir la biodisponibilidad del NO en el medio vascular. Por ello, se midieron simultáneamente los niveles plasmáticos de **L-Arginina y sus derivados metilados, ADMA y SDMA**. La **figura 76** muestra que la HCl no produjo cambios significativos en los niveles de L-arginina con valores de $111.4 \pm 6.8\mu\text{M}$ en C y $124.9 \pm 9.1\mu\text{M}$ en HCl. Tampoco cambiaron los niveles de ADMA, aproximadamente de $1\mu\text{M}$ en C e HCl, pero sí lo hicieron los niveles de SDMA que aumentaron significativamente en HCl con un valor $4.49 \pm 0.54\mu\text{M}$ ($*p < 0.05$) y $3.25 \pm 0.29\mu\text{M}$ en C. Con los valores obtenidos de L-arginina y ADMA, su *ratio* no se vio alterado.

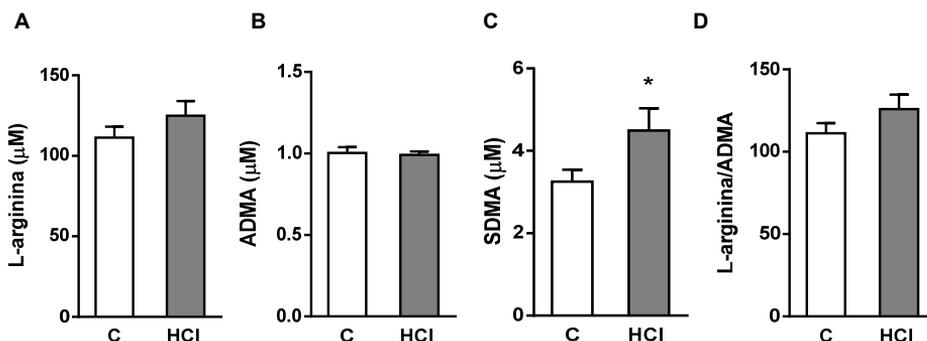


Figura 76. A. Niveles plasmáticos de L- Arginina, B. ADMA; dimetilarginina asimétrica, C. SDMA, dimetilarginina simétrica, expresados en μM . * $p < 0.05$ vs. C (Unpaired t-test) y D. *Ratio* L-Arginina/ADMA de cobayas C e HCl. Los datos están expresados como la media \pm SEM ($n=8-10$).

Aunque no están representados, también se midieron los niveles de L-arginina y sus metabolitos en el plasma procedente de las cobayas expuestas a HCS. En este caso la concentración de L-arginina se redujo el 50% en comparación con el C, con un valor de $60.4 \pm 7.4 \mu\text{M}$. Sin embargo, ni la ADMA ni la SDMA se vieron afectados lo que produjo una disminución del *ratio* L-arginina/ADMA con un valor de $66.2 \pm 6 \mu\text{M}$, una disminución que resultó significativa comparado con el C (** $p < 0.01$). Esto indica que la biodisponibilidad de L-arginina disminuyó en los cobayas tras la exposición a HCS.

La **endotelina 1** (ET-1), un potente agente vasoconstrictor, se midió en plasma de animales C y tras la exposición a HCl. La **figura 77A** muestra los niveles plasmáticos de ET-1, expresados como pg/mL , de cobayas C e HCl. Se observa que la HCl no modificó los niveles de ET-1. Los valores fueron $19.9 \pm 1.9 \text{pg/mL}$ en C y $21.5 \pm 1.8 \text{pg/mL}$ en HCl. Sin embargo, la HCS sí modificó los valores de ET-1 aumentándolos significativamente con un valor de $29.1 \pm 2.3 \text{pg/mL}$ (* $p < 0.05$; Unpaired t-test). Este dato no se encuentra representado.

Debido a que el **factor de crecimiento endotelial vascular** (VEGF) tiene un papel importante en la vasculogénesis y en la permeabilidad de los vasos regulando la circulación a largo plazo se midió en el plasma de cobayas, C e HCl, para comprobar si la HCl en el cobaya lo alteraba. La **figura 77B** representa los niveles de VEGF, expresados como pg/mL , y muestra que no hubo diferencias entre los C y los HCl con valores de $2.54 \pm 0.19 \text{pg/mL}$ y $2.62 \pm 0.19 \text{pg/mL}$, respectivamente. Por el contrario, los valores obtenidos de VEGF en plasma de cobayas tras la exposición a HCS (dato no mostrado) sí se alteraron con un aumento significativo comparado con el C ($3.76 \pm 0.48 \text{pg/mL}$; ** $p < 0.01$), como cabría esperar.

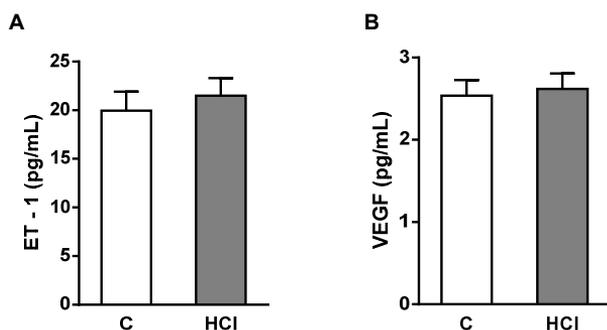


Figura 77. A. Endotelina-1 (ET-1) (n=15-16) y **B.** Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (n=14-16), expresados como pg/mL, determinados en plasma de cobayas C e HCl. Los datos están expresados como la media \pm SEM.

5.21.2 Factores hormonales: All y ANP

Un mediador vasoactivo que se midió fue la **angiotensina II (All)** debido a los valores anormalmente bajos de PAS en cobayas. Los niveles obtenidos de All en plasma de cobayas C e HCl se representan en la **figura 78A**, en la cual, se observa que la HCl tampoco alteró los niveles de All. Los valores fueron de 355.0 ± 48.8 pg/mL para los C y 380.9 ± 69.2 pg/mL para los HCl. Aunque no se observaron cambios, los valores fueron muy elevados comparados con los de rata (~ 75 pg/mL).

El **péptido natriurético atrial (ANP)** es una hormona con efecto vasodilatador liberada por las células musculares de la aurícula cardíaca como respuesta al aumento de la presión arterial. Aunque se vio un ligero aumento de la PAS (**Figura 64A**) en los cobayas tras la exposición a HCl, los valores obtenidos en plasma del ANP en este grupo no aumentaron. Como se observa en la **figura 78B** los niveles para los C y los HCl fueron de 234 ± 15 pg/mL y 208 ± 6 pg/mL, respectivamente. Tampoco se modificó tras la HCS con un valor de 220 ± 34 pg/mL, a pesar de los valores de PAS (**Figura 64C**) más elevado en este grupo de animales.

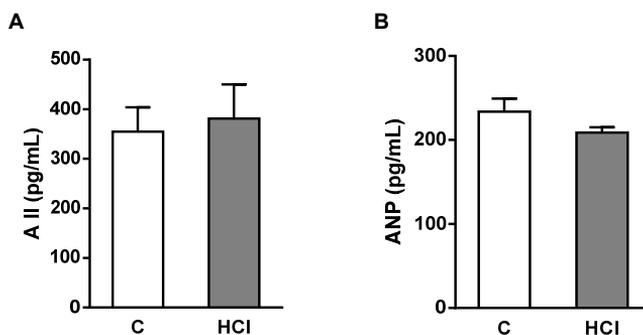


Figura 78. A. Angiotensina II (AII) (n=12-15) y **B.** Péptido natriurético atrial (ANP) (n=15-20), ambos expresados como pg/mL y determinados en plasma de cobayas C e HCl. Los datos están expresados como la media \pm SEM.

5.22 Marcadores de estrés oxidativo e inflamación

Como se ha mencionado, debido al proceso de hipoxia/reoxigenación que se produce en la apnea obstructiva del sueño por la HCl se genera un aumento de ROS y se activan mecanismos propios de la inflamación de manera generalizada (**Figura 21**). Por ello, se han determinado dos indicadores para comprobar el efecto de la HCl en el cobaya sobre el estrés oxidativo y la inflamación.

Para determinar el daño oxidativo causado por la HCl se estudió en el tejido hepático el posible aumento de estrés oxidativo a nivel mitocondrial, midiendo el cociente **aconitasa/fumarasa (A/F)**. La aconitasa es una enzima del ciclo de Krebs que disminuye por aumento de ROS. En cambio, la fumarasa, otra enzima del ciclo de Krebs, resiste al daño oxidativo permaneciendo estable, por lo que esta medida indica de manera fiable el grado de estrés oxidativo mitocondrial. En la **figura 79A** se muestra el *ratio* Aconitasa/Fumarasa medido en los animales C e HCl. Esta relación constante indicó que no hay daño oxidativo a nivel mitocondrial causado por la HCl cuando se comparó este grupo con el control.

La activación del **factor nuclear kappa B (NF- κ B)** es un indicador de inflamación. Uno de los estímulos celulares que pueden activar el NF- κ B es la producción de ROS. En este sentido se estudió si la HCl, a través de la generación de ROS, indujo o no activación de este factor. Para ello, se utilizó el hígado de los cobayas C e HCl. La **figura 79B** muestra la medida del NF- κ B en animales C y tras la exposición a HCl, expresado

como veces de aumento sobre el control. Como se observa en la figura la HCl en los cobayas no modificó la actividad del NF- κ B.

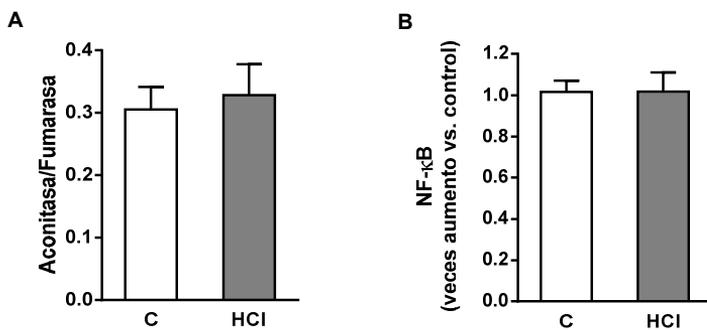


Figura 79. A. *Ratio Aconitasa/Fumarasa* medido en extracto mitocondrial de hígado de cobayas C e HCl (n=7). **B.** Nivel de activación del Factor Nuclear Kappa B (NF- κ B) medido en extracto nuclear de hígado de cobayas C e HCl (n=7). Los datos están expresados como la media \pm SEM.

Discusión

6 DISCUSIÓN

El apartado de discusión está organizado en base a los objetivos propuestos y siguiendo el orden establecido de los resultados obtenidos en los modelos animales de HCI de rata y cobaya. En primer lugar, se detallan brevemente los hallazgos más relevantes de cada modelo animal (**Tabla 8**), para seguir con la interpretación de los resultados obtenidos tras la aplicación del protocolo de HI a distintos niveles: respuesta ventilatoria y metabolismo, funcionalidad del cuerpo carotídeo, activación simpático-adrenal, actividad cardiovascular y pulmonar y función vascular.

Modelo de HCI de rata 3M vs. 20M

Los principales resultados encontrados en el modelo de HCI de rata joven y vieja son la sensibilización del CC similar en ambas edades después de 15 días de exposición a HCI. Estos resultados no se correlacionan con una sensibilización del reflejo respiratorio, medido como aumento de la respuesta ventilatoria hipóxica (RVH) en ninguna de las edades analizadas. Las ratas jóvenes muestran una alteración hemodinámica presentando hipertensión. Estos resultados se ajustan en parte a las características de los pacientes que sufren AOS, los cuales muestran un aumento en la respuesta respiratoria y una actividad nerviosa simpática elevada frente a la hipoxia aguda^{179,286}, lo que les hace propensos a desarrollar hipertensión sistémica^{177,201,287}. El envejecimiento produce un declive gradual en la función de los órganos y sistemas corporales; en este sentido la edad *per se* en las ratas produce hipertensión sin que la HCI lo modifique. Estos animales presentan una tendencia a sufrir disfunción endotelial en la arteria carótida que se ve agravada por la exposición a HCI. Aunque a nivel morfológico no se observan diferencias inducidas por la HCI, el envejecimiento en las ratas conduce a un aumento en el grosor del vaso arterial. Nuestros datos indican que la pérdida de la homeostasis por la edad prevalece manteniendo en un segundo plano los efectos perjudiciales de la HCI.

Modelo de HCI de cobaya

Los principales resultados encontrados en el modelo de HCI de cobaya son la falta de sensibilización del CC después de la exposición a HCI durante 30 días y, como consecuencia, la falta de respuesta respiratoria refleja a la hipoxia aguda (excepto a hipoxia muy intensa), la cual se ha descrito en otros roedores cuyo CC es sensible a la hipoxia^{179,286}. Desde un enfoque integrador, que combina estudios funcionales *in vivo* e

in vitro, hemos probado la hipótesis de que el efecto hipertensivo arterial sistémico de la HCl se eliminaría o atenuaría por la falta de capacidad de respuesta del CC en cobayas. Nuestros datos apoyan parcialmente esta hipótesis, mostrando que los cobayas, comparados con las ratas, tienen un cambio muy pequeño de presión arterial sistémica después de la HCl²⁸⁸, a pesar de que se producen efectos simpáticos en ambos; esto sugiere un papel crítico de los mecanismos de detección de oxígeno en el CC para la sensibilización inducida por HCl. Además, queda descartado que el aumento en la presión arterial observado después de la HCl en el cobaya se deba en parte a mecanismos independientes del reflejo quimiorreceptor como la disfunción endotelial puesto que ni las propiedades vasculares medidas como contracción y relajación del vaso ni los factores vasoactivos medidos en plasma, se alteraron en los cobayas tras la exposición a HCl²⁸⁸.

Hipoxia crónica intermitente	RATA 		COBAYA 
	3M	20M	3M
Funcionalidad del CC	✓	✓	-
Activación simpático-adrenal	↑↑	=	↑
Respuesta ventilatoria y metabólica	=	=	↓ =*
Actividad cardiovascular y pulmonar	↑↑ PAS ↑ PAP	=	↑ PAS = PAP
Daño endotelial	↑	↑	=
Factores vasoactivos	↑	=	=

Tabla 8. Resumen de los principales hallazgos observados en los modelos de HCl de rata joven y vieja y de cobaya joven. PAS: presión arterial sistémica y PAP: presión arterial pulmonar. Simbología: ✓ positivo; - negativo; = sin cambios; ↑↓ aumento/disminución; * dependiente del estímulo.

6.1 Consideraciones generales de los modelos animales de HCl

El primer modelo animal de AOS fue generado por Fletcher en 1992. Este modelo realizado en rata, tras la exposición a HCl durante 30 días, simulaba los perfiles de saturación de la HbO₂ y el desarrollo de hipertensión que suceden en pacientes con episodios de apneas. A partir de aquí, se han diseñado diferentes protocolos de HCl generando distintos modelos animales, los cuales presentan hipertensión. Sin embargo, el curso temporal de la aparición de la hipertensión y la magnitud varían en función del modelo. Los modelos pueden variar según sea: i. la intensidad de la hipoxia, que puede estar en el rango de 3 a 10%O₂; ii. la duración del estímulo hipóxico, que puede ser de 15 segundos a 4 minutos; y iii. el tiempo de tratamiento del protocolo de HI, desde una semana a más de un mes. Por último, la medida de la presión arterial sistémica que corrobora la viabilidad del modelo puede adquirirse a través de distintos sistemas de medida como son: la telemetría, obteniendo la presión sistémica en el animal despierto, utilizando un pletismógrafo de cola, que permite medir la presión arterial de manera no invasiva, o por cateterismo de una arteria en el animal anestesiado. El protocolo de HCl empleado en el presente estudio consiste en: 40 segundos de hipoxia, con un nadir de 5%O₂, seguida de 80 segundos de normoxia, durante 8 horas al día, 15 días consecutivos en rata y 30 días en cobaya. El sistema utilizado para conocer la presión arterial es mediante cateterismo en la arteria carótida del animal anestesiado.

La HCl, que imita la AOS, produce ciclos periódicos de hipoxia/reoxigenación con cambios en las presiones parciales de los gases²⁸⁹ y en el pH de la sangre arterial. Estos parámetros se midieron en las ratas jóvenes y viejas en distintos puntos del ciclo de HI para conocer el patrón correspondiente a cada edad y los efectos inducidos por la HCl. Se sabe que la edad reduce la capacidad respiratoria, el suministro de O₂ a los tejidos y la PaO₂^{290–293}. Sin embargo, en este estudio los cambios inducidos por la HCl y referentes a la edad no son muy llamativos.

Al inicio del ciclo de hipoxia crónica intermitente la PaO₂ disminuye conforme decrece el porcentaje de O₂ aplicado hasta el punto más bajo de 5%O₂; no se observan diferencias significativas excepto en el 15%O₂ donde las ratas viejas HCl tienen una menor oxigenación que los controles de su misma edad. Lo más llamativo en la medida de PaO₂ es como la HCl afecta de distinta manera a las ratas jóvenes con respecto a las viejas en la recuperación del ciclo, en concreto, al pasar del 5%O₂ al 12%O₂. En este punto, la HCl en los animales jóvenes hace que aumente considerablemente la PaO₂ (~40%) con respecto al control de su edad, mientras que en los animales viejos el pretratamiento con HCl dificulta en este paso la oxigenación con una PaO₂ menor que

para los controles de su misma edad (~30%). Estos resultados sugieren que el tratamiento de la HCl en las ratas jóvenes induce una adaptación que mejora la hiperventilación y, por tanto, la oxigenación cuando se supera la apnea, mientras que en las ratas viejas la HCl empeoraría la situación con una menor oxigenación. Sin embargo, no se observan cambios en la PaCO₂ en ninguno de los cuatro grupos de ratas estudiados, aunque la tendencia observable es a tener una PaCO₂ más baja en los animales HCl de 3 meses que en los controles, prácticamente en todos los puntos del ciclo de HCl medidos. Al contrario ocurre con los animales de 20 meses con una PaCO₂ menor en los controles. Esto corrobora mayor hiperventilación de las ratas jóvenes tras la exposición a HCl.

Sobre la misma muestra sanguínea se obtienen los valores de pH y HCO₃⁻. Los niveles de pH a distintos porcentajes de O₂ oscilan ligeramente en los cuatro grupos de animales, pero solo en normoxia es significativa la disminución producida por la HCl en las ratas jóvenes. Aunque, el pH en el punto más bajo de O₂ (5%O₂) parece coincidir en los cuatro grupos con una tendencia a aumentar con respecto a las demás medidas. Por otro lado, la HCl en los animales jóvenes disminuye los niveles de bicarbonato medidos en normoxia. Esto es reflejo de lo observado en la PaCO₂ a lo largo del ciclo de HCl.

Como era previsible, a medida que disminuye el porcentaje de O₂ en el ciclo de HCl, la saturación de HbO₂ es menor en los cuatro grupos de animales. Sin embargo, el medidor de gases utilizado para obtener dicha determinación es un equipo diseñado para una hemoglobina de sangre humana con una P₅₀~30mmHg menor que la de la rata, con una P₅₀~50mmHg, por ello los datos no son reales. En estudios previos se ha observado que tanto en las ratas jóvenes como en las viejas la HCl no modifica el hematocrito²⁶⁹, lo que quiere decir que el incremento esperado de HIF no ha sido suficiente para inducir la expresión de EPO y el aumento de nuevos eritrocitos. En hipoxia sostenida, el aumento de glóbulos rojos incrementa el suministro de oxígeno a los tejidos mediante el aumento de la eritropoyesis mediada por HIF-2, el principal regulador de transcripción del gen EPO²⁹⁴. Sin embargo, un cambio rápido de la PaO₂ desde el estado de hipoxia al de normoxia limitaría el aumento de glóbulos rojos inducido por la hipoxia, eliminando en primer lugar los nuevos glóbulos rojos o neocitos, proceso denominado neocitólisis^{295,296}. Esta podría ser la razón por la cual los pacientes con AOS, con ciclos de hipoxia grave durante el sueño, no presentan policitemia^{297,298}.

Las ratas machos de 3 y 20 meses de edad que se expusieron al protocolo de HCl presentaron un cambio en la ganancia del peso corporal. Las ratas jóvenes no modificaron su peso a lo largo de los 15 días de tratamiento, manteniéndose en el peso con el que se inició la HCl, mientras que las viejas perdieron alrededor de 40g. A

diferencia de las ratas, los cobayas expuestos por primera vez a HCl aumentaron de peso, aunque en menor grado que los controles. Este diferente comportamiento en la evolución del peso corporal entre las dos especies y entre las dos edades de la rata pudiera estar relacionado con los cambios en el metabolismo basal (VO_2) que se aprecian tras la HCl.

También realizamos medidas sanguíneas en ambos grupos de cobayas (C e HCl) para conocer el efecto de la exposición a la HI en el modelo de cobaya (**Tabla 7**). Previamente, se había observado que los cobayas anestesiados tienen una PO_2 en sangre arterial considerablemente baja de 60mmHg¹²⁹. Este hallazgo, comparable a otros valores de PaO_2 de 66 a 57mmHg descritos en cobayas despiertos y anestesiados²⁹⁹⁻³⁰¹, no se ve afectado después de la exposición a HCl, con presiones de 64mmHg frente a 65mmHg en controles²⁸⁸. A diferencia de las ratas hemos medido la saturación de la HbO_2 en el cobaya por presentar una P_{50} parecida a la de los humanos. Además de confirmar hallazgos previos, encontramos que la estimulación hipóxica (10% O_2 ; 3 min) disminuye aún más la saturación de la HbO_2 tras la HCl (44% frente a 66% en controles) posiblemente debido a que presentan un consumo de O_2 mayor²⁸⁸ (**Figura 55B**).

Se sabe que los cobayas tienen una hemoglobina de alta afinidad por el O_2 (P_{50} ~27mmHg) en comparación con las ratas. Esta alta afinidad aseguraría la oxigenación pulmonar a una PO_2 baja¹²⁸. Los valores bajos de PaO_2 y de saturación de la HbO_2 también se verían compensados por un aumento en los glóbulos rojos y como consecuencia una mayor capacidad de transporte de oxígeno en la sangre. Sin embargo, como ya se ha comentado el cambio rápido de la PaO_2 desde el estado de hipoxia al de normoxia lo dificultaría. Esta podría ser la razón por la cual los cobayas HCl tienen un hematocrito idéntico a los controles normóxicos, a pesar de un nivel significativamente más alto de EPO (214 vs. 141mU/mL en controles)²⁸⁸. El aumento del nivel de EPO en el grupo de cobayas HCl debe considerarse como una respuesta adaptativa a la HCl mediada por HIF y una prueba de que el cobaya tiene mecanismos de detección de hipoxia.

6.2 Respuesta ventilatoria y metabólica

Los resultados de este trabajo sobre la ventilación están de acuerdo con los descritos previamente en el laboratorio^{180,269}. En las ratas de ambas edades los estímulos de hipoxia e hipercapnia, a los cuales se somete a los animales, incrementaron la ventilación. Sin embargo, se observan diferencias en los parámetros ventilatorios entre

los animales jóvenes y viejos probablemente como consecuencia de la distinta sensibilización del CC originada por la HCl en ambas edades frente a los estímulos de hipoxia e hipercapnia.

Las ratas jóvenes tras la exposición a HCl presentan un VM disminuido respecto a la situación inicial frente a los distintos estímulos hipóxicos, excepto en el test de hipoxia del 7%O₂ que no hay cambios (**Figura 35C**). Esta disminución está en desacuerdo con publicaciones previas que sugieren que la HCl produce una sensibilización del CC aumentando las descargas del NSC¹⁸⁹ y generando una respuesta ventilatoria aumentada. Por tanto, las ratas jóvenes tras la exposición a HCl en comparación con la situación control (antes de la HCl), tendrían aumentada la respuesta hipóxica del CC hacia el tronco del encéfalo, aun mostrando una respuesta ventilatoria significativamente menor. Esto sugiere que la HCl produciría una integración de la señal quimiorreceptora con mayor desviación de las señales que llegan del CC a los núcleos simpáticos. Por tanto, la HCl produciría cambios plásticos adaptativos disminuyendo la señal quimiorreceptora hacia los centros respiratorios estabilizando la respiración, a pesar de la activación del reflejo quimiorreceptor por hipoxia severa, y por otro lado, facilita la transmisión quimiorreceptora aumentando el tono simpático^{302,303}.

Sin embargo, no se observan cambios en la respuesta respiratoria de las ratas viejas frente a test de hipoxia severa (10% y 7%O₂) e hipercapnia tras la exposición a HCl (**Figura 35C**). Estos animales presentan una ventilación similar a los controles, salvo en el 12%O₂ que presentan una ventilación menor. En resumen, la HCl no parece producir las mismas alteraciones adaptativas visibles en las ratas jóvenes. Además, presentan una ventilación basal disminuida, probablemente debida a la disminución de la respuesta quimiorreceptora respecto a los jóvenes²⁷¹, disminución que no implica hipoventilación; de hecho, los datos de VO₂ muestran que no hay grandes diferencias ni en los animales jóvenes ni en los viejos cuando respiran aire, 12 y 10%O₂. Solo cuando el estímulo es del 7%O₂ y 5%CO₂ las ratas viejas presentan una disminución del consumo de O₂ antes y después de la HCl. Al analizar los resultados sobre la ventilación normalizada con el metabolismo (VM/VO₂) se pierden las diferencias debidas a la edad (**Figura 36B**). Es decir, la disminución progresiva y paralela de los parámetros de VM y VO₂ en las ratas viejas hace que se mantenga constante la ventilación alveolar respecto al consumo de O₂ por minuto. También se observa en VM/VO₂ hiperventilación frente a la hipoxia (10 y 7%O₂) y a la hipercapnia (5%CO₂) en las dos edades de ratas estudiadas sin cambios debidos a la HCl.

Por último, aunque más frecuentemente se describe una respuesta respiratoria aumentada por la HCl, esta contrasta con algunos datos de la literatura en los que la

sensibilidad del reflejo respiratorio no se modifica o incluso se deprime después de la HCl. Es posible que estas diferencias se deban a las distintas metodologías utilizadas por los diversos autores^{180,184}; otra posible razón, de las diferencias observadas en la respuesta ventilatoria hipóxica en animales conscientes, es que no todos los estudios han tenido en cuenta la tasa metabólica.

Con respecto al cobaya: el hecho de que su CC sea hipofuncional y no responda al rango completo de hipoxia¹²⁹ se correlaciona con una respuesta ventilatoria atenuada en los cobayas antes y después de la exposición a HCl (**Figura 55A**). Estas respuestas respiratorias son típicas de mamíferos y humanos adaptados a la altura^{39,304}. La ausencia de hipoventilación durante la prueba de Dejours indica que, a diferencia de las ratas y otras especies, el CC en los cobayas no contribuye a la ventilación normóxica. En los experimentos de pletismografía, con el animal consciente y en libre movimiento, solo la hipoxia severa del 7%O₂ causa un aumento significativo del VM antes (30%) y después (38%) de la exposición a HCl, debido principalmente a un aumento de la frecuencia respiratoria²⁸⁸. Además, la diferencia entre ambas respuestas es significativa (25%), es decir, hay una sensibilización del reflejo quimiorreceptor después del tratamiento con HCl.

En cuanto al metabolismo, la hipoxia aguda en cobayas anterior a la exposición a HCl produce una disminución significativa del consumo de O₂ respirando 10 y 7%O₂. Una depresión metabólica justificaría la ventilación disminuida en hipoxia de los cobayas controles. Por el contrario, después de la exposición a HCl en los cobayas, se produce un aumento de aproximadamente el 50% en el consumo de oxígeno al respirar aire y se duplica al 12 y 10%O₂. Este aumento del consumo de O₂ no se correlaciona con su baja ventilación. En consecuencia, al normalizar la ventilación con el consumo de O₂ en ambos grupos, se observa hiperventilación a 10 y 7%O₂ en los cobayas antes de la exposición a HCl, mientras que tras la HCl la ventilación a 10%O₂ es menor y la del 7%O₂ no se modifica. El aumento de la ventilación y la disminución del metabolismo, al respirar 7%O₂ tras la HCl, se reflejan en los valores similares para la relación VM/VO₂ en ambos grupos de animales²⁸⁸.

La respuesta ventilatoria a la hipercapnia es muy parecida en los cobayas antes y después del tratamiento con HCl y comparable a la observada en la rata¹²⁹. Sin embargo, cuando se normaliza la ventilación con el metabolismo (VM/VO₂) también se puede observar hipoventilación debido al mayor consumo de oxígeno que se produce después de la exposición a HCl²⁸⁸. En este sentido, existen experimentos donde la denervación sensorial del CC de cobaya produce una disminución del 28% de la hiperventilación inducida al respirar una mezcla hipercápnica³⁰⁵, lo que muestra que la

hiperventilación también está mediada por quimiorreceptores a nivel central (~70%) y arterial (~30%)¹⁵.

6.3 Funcionalidad del cuerpo carotídeo

Uno de los objetivos de este trabajo es conocer cuál es la respuesta del CC frente a la hipoxia en el modelo de rata expuesta a HCl y su cambio con la edad. Cuando las CQ de los CC detectan cambios en los gases sanguíneos arteriales, estas responden con un aumento en la liberación de sus neurotransmisores. Los neurotransmisores liberados establecen la frecuencia de los potenciales de acción en el NSC. En estudios previos de nuestro laboratorio se encontró que la exposición de las ratas a la HCl tiene diferentes efectos sobre la actividad eléctrica del NSC en función de la edad²⁶⁹. Los CC procedentes de ratas viejas expuestas a HCl, aplicando los mismos test de hipoxia que en los de las ratas jóvenes, mostraron un menor aumento del incremento de la frecuencia de descargas en el NSC²⁶⁹. Con estos antecedentes, nos planteamos estudiar el metabolismo de las CA a través de su síntesis y secreción junto con las variaciones de Ca^{2+}_c en respuesta a la hipoxia. Todos ellos son buenos indicadores de la activación de las CQ, pues cuando un estímulo activa al CC se produce un aumento paralelo en estos parámetros¹⁵.

El CC de rata es un órgano catecolaminérgico siendo la DA la CA dominante en relación a la NE¹⁸⁰. Si nos referimos sólo a DA, ya que una parte muy significativa de NE se almacena en las terminaciones simpáticas intraglómicas^{275,306}, la velocidad o tasa de síntesis es similar en las ratas jóvenes y viejas (**Figura 37**). La síntesis de ³H-NE y ³H-DA, a través del precursor natural ³H-Tirosina, indica que en los CC de las ratas jóvenes y viejas controles, la DA se renueva mucho más rápido que la NE (³H-DA, 47 y 37pmol/mgCC/h y ³H-NE, 7 y 6pmol/mgCC/h, respectivamente). Esto indica que el CC está usando preferentemente DA en comparación con NE como molécula de señalización. Sorprendentemente, en los CC de ratas jóvenes tras la exposición a HCl hay una marcada disminución de la síntesis de DA (20pmol/mgCC/h), sugiriendo que la DA se usa a tasas más bajas en los HCl¹⁸⁰. Por el contrario, encontramos que la HCl no afecta a la síntesis de DA en los CC de las ratas viejas y tampoco de NE con valores similares para los cuatro grupos.

Los resultados de síntesis de NE y DA no reflejan una activación del CC por la HCl, pero se observa una mayor secreción de CA a la hipoxia, que prácticamente se triplica al 5%O₂ en ambas edades tras la HCl (**Figura 38**). Sin embargo, la secreción inducida por

el estímulo hipóxico en las ratas viejas controles es significativamente menor comparado con las jóvenes; este resultado está de acuerdo con datos previos que muestran cómo la edad disminuye la actividad del CC²⁷¹ y que se correlacionaría con una ventilación disminuida como hemos visto en estos animales.

Por último, se midieron las variaciones de Ca^{2+}_c en células disociadas de CC. El estímulo hipóxico produjo un aumento del Ca^{2+}_c en los CC de las ratas de ambas edades (**Figura 39B**), aunque algo menor en las viejas al igual que reflejaba la secreción de CA medida en CC *in vitro*. Sin embargo, la HCl no modifica el aumento de Ca^{2+}_c inducido por hipoxia en los CC de ratas jóvenes, aunque si lo hace en las viejas, llegando a incrementos de Ca^{2+}_c similares a los de las jóvenes.

La sensibilización del CC inducida por la HCl podría producirse aguas arriba de la despolarización celular en la cascada de transducción³⁰⁷. Una explicación sería la regulación positiva de los mecanismos de detección de O_2 y/o canales de K^+ sensible al O_2 ^{52,58}. Alternativamente otros mecanismos pueden estimular la liberación de CA inducida por la hipoxia de forma específica, a través, de segundos mensajeros como el AMPc y su efector el EPAC^{308,309}, cuya regulación positiva puede relacionarse con los efectos de la HCl. Esto explicaría el aumento de secreción sin aumentar el Ca^{2+}_c en los CC de las ratas jóvenes. Además, el aumento de los ROS de origen mitocondrial, probablemente debido a una regulación negativa de la superóxido dismutasa mitocondrial²⁰⁹ o inducción de alguna isoforma de NADPH oxidasa^{210,310}, es responsable de la sensibilización de las CQ a la hipoxia. Todo lo anterior referente a la secreción de ³H-CA inducido por la hipoxia en los CC de los animales HCl es directamente aplicable a la actividad en el NSC, aunque para algunos autores no existe una relación causa efecto¹¹¹. Otros neurotransmisores secretados conjuntamente con la DA, como el ATP que se co-almacena con CA o acetilcolina⁸⁵, la adenosina³¹¹ o la serotonina²¹⁰ pueden ser responsables del aumento de la actividad en el NSC. Además, han de considerarse posibles cambios en la densidad y/o afinidad de los receptores en las terminaciones nerviosas sensoriales. A todo lo anterior hay que sumarle las variables dependientes de la edad: cambios en la integración a nivel del tronco del encéfalo o cambios en los componentes eferentes o neuronales que podrían influir en los efectos inducidos por la HCl en el reflejo quimiorreceptor.

Con respecto al cobaya, los trabajos previos muestran que el escaso efecto de la hipoxia aguda en la ventilación se correlaciona con la falta de actividad del CC y la ausencia de potenciales de acción en el NSC^{129,305}. Aunque nadie ha medido la actividad aferente en el NSC tras la HCl en el cobaya, es ampliamente aceptado que la actividad quimiosensorial aferente resulta de la activación sináptica mediada por

neurotransmisores liberados de CQ^{15,86,312}. El hecho de no aumentar la secreción de CA o el Ca^{2+}_c de CC en respuesta a hipoxia en animales expuestos a HCl²⁸⁸ (**Figura 59B y 60B**), al igual que ocurre en los animales normóxicos³⁰⁵, sugiere que no hay actividad nerviosa sensorial en el CC de los cobayas. Esta sería la causa de la falta de respuesta ventilatoria hipóxica, pero no hipercápnic.

La activación de las células quimiorreceptoras por hipoxia depende de la inhibición de los canales de K^+ sensibles al O_2 de la membrana plasmática, lo que lleva a la despolarización de las células, al aumento de Ca^{2+}_i y a la liberación de neurotransmisores. Este modelo de activación de quimiorreceptores, aceptado para varios modelos animales, no se ajusta al comportamiento del CC de cobaya¹²⁹. Las CQ contienen DA que puede ser visible con anticuerpos para TH, enzima limitante de la velocidad de síntesis de las CA. En un estudio previo en cobayas en nuestro laboratorio, se analizó la presencia de TH y el contenido de CA endógena por HPLC¹²⁹. Se observaron diferencias muy claras entre las CQ de CC de rata y de cobaya con respecto a la inmunoreactividad de los anticuerpos para TH. Los estudios inmunohistoquímicos e inmunocitoquímicos revelaron una escasez de células positivas a TH, tanto en cortes como en cultivos celulares de CC de cobaya en comparación con el de rata¹²⁹. Otra diferencia es una mayor presencia de tejido conectivo, escaso en la rata. Esta podría ser la razón por la que, aunque ambas especies poseen un CC de tamaño similar, se encontraron niveles más bajos de CA en el CC de cobaya que en el de rata. La HCl no modifica el porcentaje de CQ TH positivas que es del 7% al igual que en los CC de cobayas controles. Tampoco se observan diferencias en el contenido de DA entre los controles y los HCl, con un aumento en los niveles de NE, probablemente procedente de las terminaciones simpáticas que inervan el CC²⁸⁸. No encontramos serotonina en el CC de cobayas controles o HCl, un neurotransmisor que se ha relacionado con la hiperactividad del CC de rata en HCl²¹⁰. Las células quimiorreceptoras de cobaya carecen de canales de K^+ sensibles al O_2 , y por lo tanto, carecerían de la capacidad de despolarización y de la respuesta secretora de CA frente a la hipoxia¹²⁹. Tras la exposición a HCl no observamos cambios en la respuesta secretora ni aumento de Ca^{2+}_c inducido por hipoxia, lo que sugiere que la exposición a HCl no desarrolla la capacidad de despolarización por la hipoxia en las CQ de CC de cobaya, ya sea por remodelado de canales o por regulación de su actividad.

En el CC se han descrito varios neurotransmisores almacenados en vesículas, la mayoría dependientes del aumento de Ca^{2+}_i para su liberación. Sin embargo, existe la posibilidad de que se estén liberando neurotransmisores de manera independiente del Ca^{2+}_i ³¹³. Se ha descrito que la adenosina, incluso con una hipoxia moderada, aumenta su

secreción⁸⁴, de modo que cabría la posibilidad de que los efectos de la HCI en el cobaya pudieran estar mediados por secreción independiente de Ca^{2+}_i . En este caso, deberían registrarse potenciales de acción en el NSC. Los experimentos de Schwenke¹²¹ evidencian que no es el caso, ya que no se registra actividad en el NSC de cobaya cuando se estimula con hipoxia.

En resumen, la exposición a HCI no tiene efecto sobre el CC de cobaya, y poco efecto en la ventilación basal, pero atenuó las respuestas respiratorias a los test de hipoxia aguda. La falta de respuesta a la hipoxia sugiere que la HCI no modifica la excitabilidad de las CQ del CC o su comunicación sináptica con las terminaciones aferentes. En las mismas condiciones otros roedores presentan efectos sobre el reflejo quimiosensorial que podrían dar lugar a las patologías asociadas a los efectos de la hipoxia crónica intermitente.

6.4 Actividad simpática, respuesta cardiovascular y pulmonar

Los estudios previos realizados en nuestro laboratorio, y por otros autores, muestran un aumento del tono simpático-adrenal inducido por la HCI con el resultado final del aumento de la PAS en ratas jóvenes (**Figura 40**). En modelos animales de HCI y en pacientes con AOS se han encontrado aumentos de las descargas simpáticas en el nervio cervical, torácico, esplácnico, renal y lumbar^{194,314}. Los datos muestran un aumento significativo en la actividad simpática renal, sugiriendo que el riñón juega un papel principal en la génesis de la hipertensión en animales jóvenes expuestos a HCI^{265,315}. Se ha demostrado que la hipertensión inducida en los modelos de HCI en roedores está vinculada a desregulaciones transcripcionales mediadas por HIF^{199,203}. La HCI activa HIF-1 y suprime HIF-2. Esta desregulación conduce a un aumento de la generación de ROS en el reflejo quimiosensorial, que como hemos visto, parece fundamental en el desarrollo de la hipertensión.

Sin embargo, los datos sobre la actividad quimiorreceptora del CC y de presión arterial son diferentes en animales jóvenes y viejos, controles y tras la HCI. Un estudio comparando las respuestas de los CC de ratas neonatales y jóvenes expuestas a HCI, muestra una pronunciada sensibilización hipóxica del CC neonatal sugiriendo una remodelación morfológica del tejido quimiorreceptor³¹⁶ dependiente de la edad y del desarrollo del animal. Nuestros resultados confirman que la edad *per se* genera hipertensión y que la HCI no lo modifica, lo que indica que el mecanismo por el cual actúa la HCI en los animales viejos parece estar amortiguado por la edad.

Un punto que merece un comentario especial son los resultados obtenidos sobre la modulación de la función del CC con el antagonista D2 domperidona y su repercusión en las alteraciones cardiovasculares del SAHS. En los años 90, cuando el grupo de Fletcher generó el modelo de HI que remedaba la HI encontrada en el SAHS, se obtuvo una clara evidencia de que dichas maniobras experimentales no solo producían hipertensión arterial¹⁷⁷ sino también otras alteraciones análogas a las encontradas en el SAHS de los humanos³¹⁷, en las que además el CC parecía jugar un papel importante. De forma simultánea a la descripción de los efectos producidos por la HI, los mismos autores²⁰¹ demostraron que la denervación del CC prevenía la aparición de la hipertensión; unos años más tarde, demostraron que la conexión entre el cuerpo carotídeo y la hipertensión estaba en una hiperactividad del simpático³¹⁸. Parece claro, pues, que el CC está involucrado en la génesis de la hipertensión y que la eliminación funcional del órgano quimiorreceptor por denervación evita que aparezca dicha hipertensión¹²⁰. La idea principal, aun en vigor, es que la HI causa una sensibilización del CC que le hace hiperreactivo, generando un aumento del tráfico de información al tronco del encéfalo que originaría la hiperractividad del simpático.

En los experimentos realizados para este trabajo hemos tratado de comprobar si la modulación de la función del CC, en animales sometidos a HI, equivaldría a la eliminación del órgano contribuyendo a revertir, o al menos a aminorar, las alteraciones cardiovasculares asociadas a la apnea del sueño. El CC es un órgano muy rico en dopamina, aunque su significado funcional es muy controvertido¹⁵. La razón se debe a que los receptores dopaminérgicos D2 no solo están presentes en las terminaciones nerviosas, si no que las propias células quimiorreceptoras, que contienen la dopamina, poseen autorreceptores D2 capaces de modular la función de las propias CQ y, por tanto, la funcionalidad del CC y su capacidad para responder a la hipoxia (**Figura 80**).

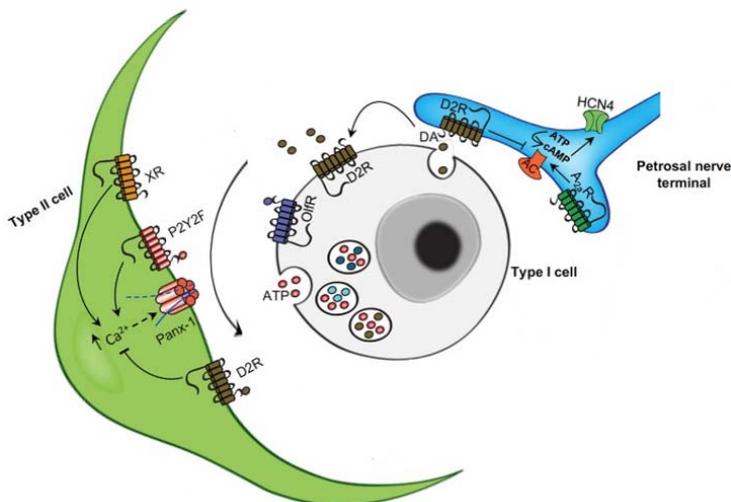


Figura 80. Receptores D2 presinápticos y postsinápticos en el cuerpo carotídeo (Modificado ref. ⁹⁹).

En un intento de modular la sensibilidad del CC, decidimos administrar domperidona en el agua de bebida a los animales expuestos a HI. La domperidona es un antagonista de receptores dopaminérgicos D2 que tiene la gran ventaja de no atravesar la barrera hematoencefálica³¹⁹ y, por tanto, carecer de posibles efectos centrales indeseables. Por otro lado, la domperidona es un fármaco con una gran seguridad terapéutica ya que se utiliza en clínica para controlar la motilidad gastroesofágica desde hace más de dos décadas. Su toxicidad es muy escasa en animales de experimentación a no ser que se utilicen dosis excesivas respecto a las dosis utilizadas en clínica. Dependiendo de la vía de administración, ya sea intramuscular o vía oral, los niveles plasmáticos pico ocurren entre 10 y 30 minutos después de ser administrada. Utilizando el diseño experimental descrito en la sección de métodos, hemos comprobado que la domperidona a la dosis de 0.75mg/kg de peso en el agua de bebida durante 15 días revierte el efecto hipertensor producido por la HI (5%O₂, 40s/21%O₂, 80s; 30ciclos de hipoxia/hora; 8h/día; 30 días) en rata y produce también una disminución en la PAS en los animales controles no sometidos a HCl (**Figura 48**). Por tanto, a nivel sistémico, podemos decir que el aumento de la presión arterial es dependiente del efecto de la dopamina.

Nuestros datos con domperidona son pues superponibles a los obtenidos con la denervación del CC. Aunque no hay experimentos que demuestren si ambas maniobras son curativas en animales que ya hayan desarrollado hipertensión arterial por haber sido expuestos previamente a HI, la ventaja del tratamiento con domperidona respecto a la denervación es obvia. Por un lado, no requiere maniobras quirúrgicas y, además, según

hemos comprobado, no altera el control ventilatorio como sería el caso de la resección del CC. La domperidona, empleada como regulador de la motricidad gastroesofágica, carece de efectos secundarios significativos a la dosis utilizada en este estudio. Quisimos explorar el efecto de la domperidona sobre otros efectos observados tras la exposición a HI, tales como la función del CC, la actividad simpática, el reflejo respiratorio o el estado redox, pero los resultados en ningún caso fueron tan concluyentes como los observados sobre la PAS.

Los efectos crónicos de la domperidona revirtiendo el efecto hipertensor de la HI también se reproducen cuando la domperidona se suministra de forma aguda (i.p. 2.5mg/kg) a las ratas que han estado previamente sometidas a HI, sin afectar los valores de la PAS de las ratas controles (**Figura 49B**). Aunque aún desconocido, pensamos que el mecanismo por el que la dopamina produce efectos hipotensores agudos y a largo plazo puede ser diferente, implicando mecanismos periféricos tras la administración aguda y periféricos y centrales, en el tratamiento crónico. Entre sus efectos cabría: reducción de la contractibilidad miocárdica y del gasto cardíaco, vasodilatación o una inhibición de la actividad de la renina plasmática, repercutiendo todos en los valores de presión arterial. Dado que la frecuencia cardíaca no se modificó tras la administración de domperidona (390 ± 12 vs. 364 ± 12 latidos/min), parece lógico pensar que afecte más a las resistencias vasculares que a la función cardíaca. En cualquier caso, estos resultados preliminares constituyen un tema importante con potencial interés traslacional en el uso de la domperidona para el manejo de la hipertensión asociada a la apnea del sueño.

Además de las alteraciones cardiovasculares la apnea del sueño conlleva la aparición de otras co-morbilidades en pacientes con dicho trastorno del sueño. Una de las patologías asociadas, aunque no exenta de controversia, es la aparición de hipertensión pulmonar³²⁰. La HCS produce hipertensión pulmonar pero los efectos de la HCI están menos claros. Esta es la razón por la que medimos la presión arterial pulmonar en las ratas HCI comparando su efecto con el de la hipoxia sostenida, situación que sucede en determinadas enfermedades respiratorias. Aunque los resultados son claros y no se observa hipertensión pulmonar tras la HCI como ocurre tras la HCS, sin embargo, existe un aumento de la presión que pudiera indicar el inicio de un deterioro en la circulación pulmonar (15.2 ± 0.6 mmHg en HCI vs. 12.7 ± 0.5 mmHg en C). El efecto pudiera deberse a que el tiempo de exposición a la HCI no es suficiente como para generar hipertensión pulmonar en estos animales. Se confirma además que no existe daño endotelial pulmonar en las ratas HCI ni alteraciones morfológicas en los vasos pulmonares. Aunque los datos de la contracción con L-NAME sugieren una menor producción de NO.

Como ya hemos visto en el cobaya, el hecho de que no se produzca sensibilización del CC inducida por la exposición a HCl, apoya nuestra hipótesis sobre si los efectos sistémicos relacionados con la HCl en otras especies deberían estar ausentes en el cobaya. Sin embargo, varios resultados paradójicos apuntan a una activación del sistema nervioso simpático después de la HCl: i. un ligero aumento en la presión arterial sistémica (~10 mmHg); ii. un aumento en la frecuencia cardíaca (~25%); iii. un aumento en los niveles de CA plasmáticos; y iv. un aumento de la síntesis de CA en la arteria renal (~40%)²⁸⁸. Los cobayas son animales hipotensos en comparación con otros roedores^{129,301}, lo cual se ha relacionado con un tono noradrenérgico disminuido y un aumento de la capilaridad en los tejidos periféricos que disminuye las resistencias periféricas. El aumento observado en los niveles de NE plasmáticos podría explicar el aumento de la PAS y de la frecuencia cardíaca presentes en los cobayas después de la exposición a HCl. Estos resultados sugieren que los cobayas poseen un mecanismo de detección de O₂, distinto del CC, responsable del reflejo simpático cardiocirculatorio^{321,322}.

El CC y la MA son tejidos simpático-adrenales con el mismo origen de desarrollo, funcionando como una unidad que origina reflejos cardiorrespiratorios en respuesta a la hipoxia sistémica. El eje funcional CC-MA es esencial para la supervivencia en el ambiente hipóxico y la respuesta más eficiente es la hiperventilación desencadenada por los quimiorreceptores del CC, casi ausentes en los cobayas¹²⁹. Por tanto, planteamos la posibilidad de que las respuestas metabólicas estén aumentadas en el cobaya como resultado de la actividad simpática (**Figura 61**) y la sensibilidad intrínseca de la MA a la hipoxia, como ocurre en los animales neonatos³²³⁻³²⁵. El aumento de los niveles plasmáticos de CA, los niveles aumentados de glucosa en ayunas y las modificaciones de la presión arterial observadas en los cobayas tras la HCl podrían tener su origen en la sensibilización de la MA a la hipoxia. Encontramos un aumento endógeno de CA (principalmente NE) en GCS, pero no hay cambios en el contenido de CA en la MA²⁸⁸. Las terminaciones nerviosas simpáticas son el origen de la NE en el plasma y la E plasmática es secretada desde la MA, por lo que los niveles plasmáticos de ambas CA pueden representar un índice del tono simpático general³²⁶. La relación de E/NE en plasma podría cambiar bajo condiciones de estrés, como pudiera ser la HCl. Por lo tanto, el hecho de que la fuente de las CA sea diferente permitiría revelar el origen de las CA plasmáticas responsables de tal efecto: una activación intermitente de la MA por hipoxia aumentaría la relación E/NE. Sin embargo, la relación E/NE en el plasma es menor en los cobayas HCl que en los C, lo que indica que la contribución de la MA a las CA plasmáticas es menor que la contribución de las terminaciones simpáticas. La HCl no

parece activar la MA, aunque el tono simpático está aumentado como se pone de manifiesto por el aumento de CA plasmáticas y de NE en el GCS tras la HCl.

Para explorar la posible sensibilidad intrínseca a la hipoxia de la MA tras la exposición a HCl, analizamos el curso temporal del flujo de CA de MA aisladas en ambos grupos de cobayas (**Figura 63**). La exposición a HCl no altera el curso temporal de secreción adrenomedular de E y NE al estimular con hipoxia la MA *in vitro*²⁸⁸. Se esperaba la falta de respuesta a la hipoxia de la MA procedente de animales adultos debido a los hallazgos previos de nuestro laboratorio en MA aislada de cobaya¹²⁹ y células adrenomedulares de rata³²⁷. Aunque el grupo de Prabhakar ha demostrado que la HCl induce estrés oxidativo y facilita la secreción de CA en secciones de MA de ratas adultas¹⁸¹, nuestros resultados muestran lo contrario. La ausencia de la respuesta *in vitro* de la MA y del CC a la hipoxia en cobayas lleva a preguntarse cómo se produce la activación simpático-adrenal tras la HCl. En rata, la respuesta sería desencadenada por reflejos del CC^{15,328}, pero en cobayas, debido a la falta de funcionalidad de su CC, debe haber estructuras adicionales sensibles a la hipoxia capaces de desencadenar la activación simpático-adrenal. Varios estudios han identificado regiones del hipotálamo caudal y áreas de la médula ventrolateral rostral activadas directamente por hipoxia en diferentes especies, aumentando las descargas simpáticas, la presión arterial y la frecuencia cardíaca^{322,329,330}.

Hemos visto que el cobaya es un animal hipotenso y que la HCl conduce a un ligero aumento de la PAS en estos animales²⁸⁸, aunque los valores siguen siendo bajos con respecto a la presión de otros roedores como la rata, que los duplica. También se comprobó la diferencia entre las especies analizando la respuesta a un test de hipoxia (10%O₂; 3 min). Observamos que se produce una ligera disminución de la presión, pero también menor que la respuesta en rata. Con estos datos de presiones expusimos un grupo de cobayas a HCS para comparar los efectos de ambos protocolos de hipoxia y con los datos previos del laboratorio. La HCS es una situación característica de varias enfermedades pulmonares, una de ellas la EPOC, generando fundamentalmente hipertensión pulmonar¹⁷. Observamos un pequeño aumento de presión sistémica en los cobayas en HCl que es insignificante con los valores de presión arterial en los animales HCS con un valor en torno a 90mmHg (**Figura 64**). En HCS la presión arterial se normaliza con respecto a la de otros roedores, es decir, el cobaya se comporta hemodinámicamente como si la hipoxia ajustara el “setpoint” en el cobaya hacia valores correspondientes a normoxia en los otros roedores.

También, hemos medido la presión pulmonar en las tres condiciones en los cobayas: controles, HCl e HCS y analizando su VPH (**Figura 66**). La VPH es un mecanismo

homeostático de protección contra la hipoxia, sin embargo, también puede causar daño pulmonar e hipertensión cuando la hipoxia alveolar sostenida es global y duradera, como ocurre en la EPOC y en la exposición a HCS. Encontramos que tras la HCI no hay cambios en la PAP y tanto los controles como los HCI conservan la VPH, es decir, aunque el CC parece no ser sensible a la hipoxia, el cobaya posee otros tejidos sensibles a la hipoxia como las arterias pulmonares. Por otro lado, los cobayas en HCS muestran una PAP elevada y una pérdida de la VPH, además de policitemia. A diferencia de lo que ocurre en la HCI, la HCS aumenta el hematocrito hasta el 70%. Este es un claro ejemplo de respuesta adaptativa a la hipoxia mediada por HIF que corrobora la sensibilidad al oxígeno de algunos tejidos en el cobaya.

6.5 Función vascular

Otro mecanismo propuesto que podría generar hipertensión inducida por la HCI de una manera independiente del reflejo quimiorreceptor por activación del CC es la disfunción endotelial generada de manera paracrina o endocrina por agentes vasoactivos e inflamatorios^{149,221}. Durante la HI, debido al proceso de hipoxia/reoxigenación, se produce de forma generalizada un incremento de ROS y la activación de los mecanismos de la inflamación, produciendo daño endotelial. En estudios previos del grupo se ha observado que la HCI en ratas jóvenes produce un estado pro-oxidativo a diferencia de las ratas viejas, en las que no se modifica²⁶⁹. Cada episodio de HCI puede ser considerado como una fuente de producción de ROS a nivel de las células endoteliales^{270,273} que sería la causa de un posible daño endotelial y del remodelado de la pared de los vasos sanguíneos en las ratas expuestas a HCI. Con la edad, la HCI no sólo no afectaría la producción de ROS sino que no se esperaría un mayor daño endotelial asociado al daño oxidativo²⁶⁹. Con estos antecedentes nos planteamos estudiar a nivel vascular el alcance de la exposición a 15 días de HCI en las ratas jóvenes y viejas.

Un mecanismo implicado en la disfunción endotelial en la apnea obstructiva del sueño podría ser la disminución de la disponibilidad del NO. Como el endotelio ejerce un papel crucial en la modulación del tono vascular liberando NO, que causa vasodilatación local, en primer lugar, se midió la respuesta vasorrelajante dependiente del endotelio en la arteria carótida y la contribución del NO en la misma. Dicha respuesta se evaluó mediante la aplicación del agonista colinérgico carbacol a las arterias *in vitro*. La acetilcolina, y su agonista sintético el carbacol, libera NO procedente de las células endoteliales de la arteria; por tanto, su efecto sobre la relajación en una arteria

precontraída se puede usar como un índice de la integridad vascular. Los resultados de este estudio muestran que las ratas jóvenes expuestas a HCl no desarrollan disfunción endotelial en la arteria carótida, aunque se observa una tendencia a relajarse menos con el carbacol que los controles, al igual que sucede en las ratas viejas, en las que además la HCl lo agrava. El efecto inhibitor del L-NAME sobre la relajación en las arterias carótidas HCl no muestra menor disponibilidad de NO que en los controles. Sin embargo, a nivel plasmático (nitritos y nitratos)³³¹ los niveles de NO son más altos en las ratas jóvenes HCl, sin cambios en las ratas viejas. La activación de la ruta nitrato-nitrito-NO es una fuente alternativa del NO que puede ejercer efectos antihipertensivos. Esta conversión podría ser particularmente efectiva en las condiciones de hipoxia y acidosis como ocurre en el músculo esquelético durante el ejercicio³³².

La hipertensión también se ha asociado con niveles plasmáticos elevados de ADMA, un derivado de L-arginina procedente de la degradación proteica, considerado como un factor de riesgo cardiovascular³³³⁻³³⁵. La ADMA y su estereoisómero SDMA, se forman a partir de la metilación de residuos de L-arginina proteico mediante el enzima PMRT, con actividad metil transferasa. La metilación es irreversible y los residuos de L-arginina metilada forman parte integral de la proteína hasta que se degrada por la metil hidrosilasa DDAH. La ADMA actúa como un inhibidor endógeno competitivo de la NOS^{334,336,337} y la SDMA, aunque no inhibe la NOS, compite con la L-arginina en su transporte celular. Diversos estudios muestran que los ROS y la inflamación aumentan la expresión de la PRMT, inhiben la de DDAH y aumentan los niveles de ADMA, y que estos efectos se revierten por el uso de antioxidantes²⁵²⁻²⁵⁴. Los transportadores de aminoácidos catiónicos en la membrana facilitan el transporte de ADMA citosólico y de SDMA a la circulación³³⁷. Un mayor nivel de ADMA en el plasma puede ser una consecuencia del estrés oxidativo y se ha considerado como una de las causas de la disfunción endotelial en muchas condiciones patológicas. Se ha descrito también que existe una correlación entre los niveles de ADMA circulante, la producción de NO y la presión arterial en pacientes sin enfermedad vascular conocida y con hipertensión temprana³³⁸. Los niveles anormalmente altos de ADMA o SDMA inhibirían la actividad de la eNOS que junto con una disminución de la L-arginina, generaría una menor producción de NO incrementando el tono vascular y la pérdida de la vasorelajación dependiente del endotelio. En nuestro estudio, la hipertensión sistémica en ratas jóvenes expuestas a HCl no se correlaciona con cambios ni en ADMA ni en SDMA plasmática, ya que la primera no se modifica y la segunda se encuentra en menor concentración que el control. Cuando observamos lo que ocurre en las ratas viejas, con una mayor tendencia a padecer disfunción endotelial *per se*, sorprende la presencia de niveles de ADMA y SDMA por debajo de los de las ratas jóvenes controles y esta disminución no se

acompaña con un descenso de los niveles de L-arginina. Por tanto, la relación entre L-arginina/ADMA es superior en las ratas viejas con respecto a las jóvenes (**Figura 46**), es decir, parece como si el metabolismo de la L-arginina mejorara con la edad y no se alterara con la exposición a HCl.

Existen estudios contradictorios sobre si los niveles aumentados de ADMA se relacionan o no con la hipertensión^{333,339} e incluso se ha descrito que una disminución de ADMA circulante se correlacionaría con los niveles de angiotensina II. Parece que el tratamiento de la hipertensión con fármacos dirigidos al sistema de la angiotensina reduce los niveles circulantes de ADMA³⁴⁰. Nuestros datos sugieren que los aumentos en la presión arterial sistémica asociada a la HCl en las ratas jóvenes no están asociados a cambios en ADMA o SDMA. Tampoco vemos relación con los niveles de angiotensina II, pues la HCl en las ratas jóvenes genera un aumento con respecto a los controles de su misma edad, y en las viejas, cuyos niveles son menores comparando las edades, la HCl no los modifica.

A nivel morfológico la HCl durante 15 días tampoco alteró ni el grosor de la pared vascular ni el área de la luz de las arterias carótidas de las ratas jóvenes y viejas (**Figura 44**). Sí se observa una diferencia debida a la edad en el grosor de la pared de la arteria con un aumento aproximado del 25%. Es posible que el tratamiento de HCl de 15 días en las ratas jóvenes sea insuficiente para observar cambios a nivel de la pared vascular, sin embargo, no ocurre lo mismo al referimos a los efectos inducidos en el reflejo quimiosensorial durante ese mismo tiempo.

Con estos datos fundamentalmente negativos cabe preguntarse cuál es el desencadenante de la hipertensión arterial sistémica tras la HCl. El aumento de angiotensina II en las ratas jóvenes tras la HCl pudiera ser el responsable del aumento de la PAS observado y a su vez de la hipertrofia del ventrículo izquierdo (**Figura 41B**).

También realizamos el estudio de la respuesta vascular en la arteria carótida y en la pulmonar de cobaya comparando el modelo de HCl y de HCS con el control, ya que observamos entre ellos claras diferencias tanto en los valores de presión arterial sistémica como en los de la presión pulmonar. Observamos que las propiedades contráctiles a PE en la carótida son idénticas en los tres grupos, pero llama la atención la escasa contracción incluso a dosis altas de fenilefrina; en la arteria pulmonar se comportan los tres grupos igual pero su contractilidad es mayor que en la carótida. Cuando estudiamos la relajación a carbacol encontramos que las arterias procedentes de animales HCl se comportan igual que los controles, pero en el caso de las arterias HCS hay una menor relajación a carbacol, que es más acusado en la arteria pulmonar

que en la carótida, que puede correlacionarse con las altas presiones alcanzadas tras la HCS. También hemos determinado el papel del NO endotelial en estas arterias a través del bloqueo con L-NAME, un antagonista competitivo de la NOS. El L-NAME produjo una mayor contracción a las mismas dosis de PE, lo que pone de manifiesto la contribución del NO en el tono vascular; también por el mismo mecanismo se observa una menor relajación con carbacol. En conjunto, estos resultados indican que la HCl no modificó las propiedades vasculares en el cobaya mientras que en HCS tanto la arteria carótida como la pulmonar presentan algún grado de disfunción endotelial.

Para conocer la biodisponibilidad del NO en los cobayas tras la HCl se midieron los metabolitos del NO plasmáticos, y en consonancia con los resultados anteriores en los que la HCl no afecta a la contracción y relajación de las arterias, los niveles de nitritos en el plasma de los cobayas HCl no estaban disminuidos si no aumentados (**Figura 75**). Este es un dato que también se observa en las ratas jóvenes HCl y para el que no tenemos ninguna explicación, salvo que el NO medido en plasma tenga otro origen diferente al endotelio vascular. La HCl no produjo modificaciones en el metabolismo de la L-arginina en el cobaya, pero aumentó los niveles de SDMA (**Figura 76**) que podrían competir en la disponibilidad de la L-arginina, sin inhibir la eNOS. Sin embargo, el precursor del NO, la L-arginina, disminuye en un 50% tras la exposición a HCS frente a la concentración de L-arginina en controles. Aunque la HCS no incrementa los niveles de ADMA, el *ratio* L-arginina/ADMA está disminuido, lo que indica que en la condición de hipoxia sostenida la biodisponibilidad de la L-arginina es mucho menor que en la hipoxia intermitente y esto favorecería la pérdida de función del endotelio adquiriendo un fenotipo vasoconstrictor como hemos comentado anteriormente en el estudio sobre la relajación arterial frente al carbacol.

Debido al escaso cambio en el metabolismo de la NO, hemos medido otras sustancias vasoactivas que podrían estar alterando el balance entre la vasoconstricción y la vasodilatación, en los tres grupos de cobayas: controles, HCl e HCS. La ET-1 y la Ang II, dos sustancias vasoconstrictoras relacionadas también con la proliferación endotelial y del músculo liso vascular en HCl²⁶⁰, no se vieron alteradas por la exposición a HCl; sin embargo, en los cobayas HCS encontramos la ET-1 aumentada. Estos datos están de acuerdo con lo observado anteriormente sobre el fenotipo vascular de los cobayas HCl e HCS. Por otro lado, los niveles del péptido natriurético atrial, un polipéptido con un efecto vasodilatador potente secretado en las células del músculo cardíaco como respuesta al aumento de la presión arterial, no se modifica ni en HCl ni en HCS a pesar del aumento de presión producido en ambos modelos. Además, hemos medido los niveles del VEGF, un factor que contribuye a la angiogénesis inducida por la hipoxia²⁶⁶, observando un

aumento en los HCS, como una respuesta adaptativa mediada por HIF, sin modificarse en los animales tras la HCl. De nuevo vemos que la HCl en los cobayas tampoco modifica el balance entre la vasoconstricción y la vasodilatación. Por último, el estudio morfológico de las arterias carótidas y pulmonares de cobayas controles e HCl respalda los datos anteriormente discutidos, ya que ni el grosor de la pared vascular ni el área de los vasos se modifican tras 30 días de HCl, concluyendo que a nivel vascular los cobayas controles e HCl tienen el mismo comportamiento.

Por último, debido a que la disfunción endotelial en la HCl se produciría como consecuencia de la generación de ROS e inflamación, una de las determinaciones realizadas como índice del estrés oxidativo mitocondrial es la actividad de la aconitasa y de la fumarasa en el hígado. La aconitasa y la fumarasa son enzimas del ciclo de Krebs, la primera se ve disminuida por aumento de los ROS, mientras que la fumarasa permanece estable frente al daño oxidativo, de modo que esta medida indica de manera fiable el grado de estrés oxidativo mitocondrial. Además, como hemos comprobado en estudios previos de nuestro grupo, el hígado parece ser el órgano más sensible al daño oxidativo en rata²⁶⁹. El *ratio* A/F no se modifica, lo que indica a priori que no hay un cambio del estado oxidativo mitocondrial en el hígado de cobaya inducido por la HCl. La activación del factor nuclear Kappa B también parece ser dependiente de la producción de ROS³⁴¹. El NF-kB en el citosol está formando un complejo con la subunidad inhibitoria kB la cual puede ser fosforilada con dependencia del estado redox. El NF-kB libre se transloca al núcleo uniéndose a los promotores que regulan la expresión de genes de citoquinas inflamatorias. Nuestros resultados muestran que la HCl tampoco parece generar un estado proinflamatorio, ya que no altera los niveles de NF-kB, reforzando el resultado de que la HCl no genera aumento de ROS en el cobaya (**Figura 79**).

En resumen, ambos modelos animales, rata y cobaya, tras la HCl presentan activación simpática que genera una clara hipertensión en las ratas y un aumento de la presión arterial en los cobayas. En el cobaya, al contrario de la rata, este efecto inducido por la HCl parece ser independiente del reflejo quimiorreceptor originado en el cuerpo carotídeo, sugiriendo que otro quimiorreceptor, probablemente central, sea el responsable del reflejo simpático cardio-circulatorio. Por lo tanto, pensamos que el cobaya constituye un modelo muy interesante para estudiar la sensibilidad del tronco encefálico a la hipoxia, la plasticidad en la detección del oxígeno y la respuesta cardiovascular endocrina provocada por la HCl. Se necesitan más estudios para aclarar los mecanismos que subyacen en la falta de efectos a largo plazo de la exposición a HCl en el CC del cobaya que esclarezcan el papel del CC en la génesis de la hipertensión en la AOS. Futuros estudios podrían estar encaminados en el análisis genético comparativo

de los elementos que constituyen el reflejo quimiorreceptor. Aunque su cuerpo carotídeo no responda a la hipoxia y tampoco se sensibilice por la hipoxia crónica intermitente y sostenida, el cobaya muestra sensibilidad a la hipoxia puesto de manifiesto a través de otros efectos como el aumento de eritropoyetina en hipoxia y la VPH. Si carece de reflejo quimiorreceptor-ventilatorio cabe preguntarse cómo el cobaya es capaz de defenderse de la hipoxia. Aunque desconocemos la respuesta, teniendo en cuenta los resultados de este trabajo, una hipótesis es que lo hacen ajustando su metabolismo anaerobio, ya que, hemos visto que bajo test de hipoxia disminuyen el consumo de O₂. La AOS a través de la sensibilización del cuerpo carotídeo se ha relacionado con trastornos metabólicos como la resistencia a la insulina y la diabetes. Por ello, el cobaya también podría ser un buen modelo negativo, por la hipofuncionalidad de su CC, en el estudio del síndrome metabólico.

Conclusiones

7 CONCLUSIONES

1. La ventilación basal y la respuesta ventilatoria a la hipoxia e hipercapnia en la rata disminuye con la edad. La exposición a HCl no modifica el patrón respiratorio a ninguno de los estímulos probados en las ratas viejas. Su consumo de oxígeno en hipoxia severa (7%O₂) e hipercapnia (5%CO₂) disminuye, de modo que la ventilación normalizada con el consumo de oxígeno es idéntica a la de las ratas jóvenes.
2. Los cobayas responden a la hipoxia disminuyendo el consumo de oxígeno y a la hipercapnia y a la hipoxia severa aumentando la ventilación. Tras la exposición a HCl el consumo de oxígeno basal y con todos los estímulos aumenta respecto a los controles, perdiendo la respuesta hiperventilatoria excepto a la hipoxia severa y a la hipercapnia.
3. La respuesta secretora del cuerpo carotídeo a la hipoxia (5%O₂) en las ratas viejas es menor que la de las jóvenes; sin embargo, la HCl sensibiliza el cuerpo carotídeo produciendo un aumento de Ca²⁺_c y de secreción de catecolaminas que alcanza niveles similares a los de las ratas jóvenes.
4. En el cobaya la HCl no sensibiliza la respuesta quimiorreceptora del cuerpo carotídeo a la hipoxia, confirmándose la hipofuncionalidad de este órgano y la falta de sensibilización a la HCl.
5. La exposición a HCl en el cobaya produce un ligero aumento de la presión arterial sistémica y de la frecuencia cardíaca que puede correlacionarse con el aumento de actividad simpática observado. Sin embargo, las ratas viejas presentan hipertensión debida a la edad y no se modifica tras la HCl, al igual que la actividad simpática.
6. El bloqueo dopaminérgico crónico con domperidona produce un efecto hipotensor en las ratas controles y elimina la hipertensión arterial inducida por la exposición a HCl. La domperidona aplicada de forma aguda contrarresta también la hipertensión arterial asociada a la HCl, constatando la importancia de la dopamina en algunos de los efectos asociados a la HCl.
7. La HCl aumenta ligeramente la presión arterial pulmonar en rata, sin cambios en la morfología de la arteria pulmonar, probablemente asociada a una menor producción de óxido nítrico. Estos resultados sugieren que la apnea obstructiva del sueño a largo plazo pueda generar hipertensión pulmonar.

8. A pesar de la hipertensión sistémica y del mayor grosor de la pared vascular observados en las ratas viejas, la respuesta vascular *in vitro* en arterias carótidas apenas se modifica, aunque se observa una leve tendencia a la disfunción endotelial acentuada tras la exposición a HCl. Ni factores endoteliales, como el óxido nítrico, ni hormonales, como la angiotensina II, parecen ser los responsables del efecto hipertensivo en las ratas viejas en ninguna de las dos situaciones.
9. El aumento de la presión arterial sistémica en el cobaya no se acompaña de ningún cambio en la función vascular. Descartado un aumento del estrés oxidativo y de mediadores inflamatorios, el efecto parece ser debido exclusivamente a la activación simpática no mediada por la sensibilización del cuerpo carotídeo.
10. En resumen, la HCl produce sensibilización del cuerpo carotídeo en la rata vieja sin modificaciones cardiovasculares aparentes. Por el contrario, la HCl en el cobaya modifica parámetros cardiovasculares y metabólicos sin cambios en la funcionalidad del cuerpo carotídeo.

Bibliografía

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Wenger RH. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol.* 2000 Apr;203(Pt 8):1253–63.
2. Martin D, Windsor J. From mountain to bedside: understanding the clinical relevance of human acclimatisation to high-altitude hypoxia. *Postgrad Med J.* 2008 Dec;84(998):622–627; quiz 626.
3. Richardson RS, Noyszewski EA, Kendrick KF, Leigh JS, Wagner PD. Myoglobin O₂ desaturation during exercise. Evidence of limited O₂ transport. *J Clin Invest.* 1995 Oct;96(4):1916–26.
4. Leithner C, Rojl G. The oxygen paradox of neurovascular coupling. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2014 Jan;34(1):19–29.
5. Pittman RN. Oxygen Transport in Normal and Pathological Situations: Defects and Compensations. Morgan & Claypool Life Sciences; 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54113/>
6. López-Barneo J, del Toro R, Levitsky KL, Chiara MD, Ortega-Sáenz P. Regulation of oxygen sensing by ion channels. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2004 Mar;96(3):1187-1195-1172.
7. Neubauer JA. Invited review: Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2001 Apr;90(4):1593–9.
8. Huang SY, Moore LG, McCullough RE, McCullough RG, Micco AJ, Fulco C, et al. Internal carotid and vertebral arterial flow velocity in men at high altitude. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1987 Jul;63(1):395–400.
9. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 2012 Feb 3;148(3):399–408.
10. Prabhakar NR. Oxygen sensing during intermittent hypoxia: cellular and molecular mechanisms. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2001 May;90(5):1986–94.
11. Mou XB, Howard LS, Robbins PA. A protocol for determining the shape of the ventilatory response to hypoxia in humans. *Respir Physiol.* 1995 Aug;101(2):139–43.
12. Fitzgerald RS. Oxygen and carotid body chemotransduction: the cholinergic hypothesis - a brief history and new evaluation. *Respir Physiol.* 2000 Apr;120(2):89–104.
13. West JB. High-altitude medicine. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Dec 15;186(12):1229–37.
14. Ainslie PN, Kolb JC, Ide K, Poulin MJ. Effects of five nights of normobaric hypoxia on the ventilatory responses to acute hypoxia and hypercapnia. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003 Nov 14;138(2–3):193–204.
15. Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev.* 1994 Oct;74(4):829–98.

16. Kumar P, Prabhakar NR. Peripheral chemoreceptors: function and plasticity of the carotid body. *Compr Physiol*. 2012 Jan;2(1):141–219.
17. Voelkel NF, Mizuno S, Bogaard HJ. The role of hypoxia in pulmonary vascular diseases: a perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2013 Apr 1;304(7):L457–465.
18. Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JPT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev*. 2012 Jan;92(1):367–520.
19. Hainsworth R, Drinkhill MJ, Rivera-Chira M. The autonomic nervous system at high altitude. *Clin Auton Res Off J Clin Auton Res Soc*. 2007 Feb;17(1):13–9.
20. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Jun 6;92(12):5510–4.
21. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiol Bethesda Md*. 2009 Apr;24:97–106.
22. Benarroch EE. Hypoxia-induced mediators and neurologic disease. *Neurology*. 2009 Aug 18;73(7):560–5.
23. Ge R-L, Witkowski S, Zhang Y, Alfrey C, Sivieri M, Karlsen T, et al. Determinants of erythropoietin release in response to short-term hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2002 Jun;92(6):2361–7.
24. Klein E, Georges A, Brossaud J, Bosredon K de, Bordenave L, Corcuff J-B. [Erythropoietin: indications and measurement]. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2009 Oct;67(5):505–15.
25. Eckardt KU, Ratcliffe PJ, Tan CC, Bauer C, Kurtz A. Age-dependent expression of the erythropoietin gene in rat liver and kidneys. *J Clin Invest*. 1992 Mar;89(3):753–60.
26. Abbrecht PH, Littell JK. Plasma erythropoietin in men and mice during acclimatization to different altitudes. *J Appl Physiol*. 1972 Jan;32(1):54–8.
27. Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ. Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol*. 1992 Sep;263(3 Pt 2):F474–481.
28. Firth JD, Ebert BL, Ratcliffe PJ. Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem*. 1995 Sep 8;270(36):21021–7.
29. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P, et al. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*. 1996 Dec 20;271(51):32529–37.
30. Conrad PW, Millhorn DE, Beitner-Johnson D. Hypoxia differentially regulates the mitogen- and stress-activated protein kinases. Role of Ca²⁺/CaM in the activation of MAPK and p38 gamma. *Adv Exp Med Biol*. 2000;475:293–302.
31. Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, et al. ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett*. 2000 Feb 18;468(1):53–8.

32. Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD, Burrier A, Webb RL, Rigel DF, et al. Tissue-specific pattern of stress kinase activation in ischemic/reperfused heart and kidney. *J Biol Chem.* 1997 Aug 8;272(32):19943–50.
33. Chihab R, Ferry C, Koziel V, Monin P, Daval JL. Sequential activation of activator protein-1-related transcription factors and JNK protein kinases may contribute to apoptotic death induced by transient hypoxia in developing brain neurons. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998 Dec 10;63(1):105–20.
34. Alvarez-Tejado M, Naranjo-Suarez S, Jiménez C, Carrera AC, Landázuri MO, del Peso L. Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. *J Biol Chem.* 2001 Jun 22;276(25):22368–74.
35. López-Barneo J, López-López JR, Ureña J, González C. Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science.* 1988 Jul 29;241(4865):580–2.
36. Conforti L, Millhorn DE. Selective inhibition of a slow-inactivating voltage-dependent K⁺ channel in rat PC12 cells by hypoxia. *J Physiol.* 1997 Jul 15;502 (Pt 2):293–305.
37. Williams SEJ, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, et al. Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science.* 2004 Dec 17;306(5704):2093–7.
38. Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J.* 2012 Apr;33(7):829–837, 837a–837d.
39. Beall CM. Two routes to functional adaptation: Tibetan and Andean high-altitude natives. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 15;104 Suppl 1:8655–60.
40. Mazess RB, Picon-Reategui E, Thomas RB, Little MA. Oxygen intake and body temperature of basal and sleeping Andean natives of high altitude. *Aerosp Med.* 1969 Jan;40(1):6–9.
41. Beall CM, Brittenham GM, Strohl KP, Blangero J, Williams-Blangero S, Goldstein MC, et al. Hemoglobin concentration of high-altitude Tibetans and Bolivian Aymara. *Am J Phys Anthropol.* 1998 Jul;106(3):385–400.
42. Beall CM. Andean, Tibetan, and Ethiopian patterns of adaptation to high-altitude hypoxia. *Integr Comp Biol.* 2006 Feb;46(1):18–24.
43. Beall CM, Strohl KP, Blangero J, Williams-Blangero S, Almasy LA, Decker MJ, et al. Ventilation and hypoxic ventilatory response of Tibetan and Aymara high altitude natives. *Am J Phys Anthropol.* 1997 Dec;104(4):427–47.
44. Beall CM, Laskowski D, Strohl KP, Soria R, Villena M, Vargas E, et al. Pulmonary nitric oxide in mountain dwellers. *Nature.* 2001 Nov 22;414(6862):411–2.
45. Hoppeler H, Vogt M, Weibel ER, Flück M. Response of skeletal muscle mitochondria to hypoxia. *Exp Physiol.* 2003 Jan;88(1):109–19.
46. Kayser B, Hoppeler H, Desplanches D, Marconi C, Broers B, Cerretelli P. Muscle ultrastructure and biochemistry of lowland Tibetans. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1996 Jul;81(1):419–25.

47. Zoll J, Ponsot E, Dufour S, Doutreleau S, Ventura-Clapier R, Vogt M, et al. Exercise training in normobaric hypoxia in endurance runners. III. Muscular adjustments of selected gene transcripts. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2006 Apr;100(4):1258–66.
48. Gauda EB, Carroll JL, Donnelly DF. Developmental maturation of chemosensitivity to hypoxia of peripheral arterial chemoreceptors--invited article. *Adv Exp Med Biol*. 2009;648:243–55.
49. Rico AJ, Prieto-Lloret J, Gonzalez C, Rigual R. Hypoxia and acidosis increase the secretion of catecholamines in the neonatal rat adrenal medulla: an *in vitro* study. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005 Dec;289(6):C1417-1425.
50. Heymans C, Bouckaert JJ. Sinus caroticus and respiratory reflexes: I. Cerebral blood flow and respiration. Adrenaline apnoea. *J Physiol*. 1930 Apr 14;69(2):254–66.
51. The Carotid Body Chemoreceptors. Chapman & Hall; 1997. 264 p.
52. González C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors. *Trends Neurosci*. 1992 Apr;15(4):146–53.
53. Pearse AG, Polak JM, Rost FW, Fontaine J, Le Lièvre C, Le Douarin N. Demonstration of the neural crest origin of type I (APUD) cells in the avian carotid body, using a cytochemical marker system. *Histochem Histochem Histochim*. 1973;34(3):191–203.
54. Rocher A, Caceres AI, Obeso A, Gonzalez C. Tetrodotoxin as a tool to elucidate sensory transduction mechanisms: the case for the arterial chemoreceptors of the carotid body. *Mar Drugs*. 2011 Dec;9(12):2683–704.
55. Kondo H, Iwanaga T, Nakajima T. Immunocytochemical study on the localization of neuron-specific enolase and S-100 protein in the carotid body of rats. *Cell Tissue Res*. 1982;227(2):291–5.
56. Murali S, Nurse CA. Purinergic signalling mediates bidirectional crosstalk between chemoreceptor type I and glial-like type II cells of the rat carotid body. *J Physiol*. 2016 Jan 15;594(2):391–406.
57. Nurse CA, Leonard EM, Salman S. Role of glial-like type II cells as paracrine modulators of carotid body chemoreception. *Physiol Genomics*. 2018 Apr 1;50(4):255–62.
58. González C, Rocher A, Zapata P. [Arterial chemoreceptors: cellular and molecular mechanisms in the adaptative and homeostatic function of the carotid body]. *Rev Neurol*. 2003 Feb 1;36(3):239–54.
59. Peers C, Green FK. Inhibition of Ca(2+)-activated K+ currents by intracellular acidosis in isolated type I cells of the neonatal rat carotid body. *J Physiol*. 1991 Jun;437:589–602.
60. Buckler KJ, Williams BA, Honore E. An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol*. 2000 May 15;525 Pt 1:135–42.
61. Rakoczy RJ, Wyatt CN. Acute oxygen sensing by the carotid body: a rattlebag of molecular mechanisms. *J Physiol*. 2018 Aug;596(15):2969–76.
62. Chang AJ, Ortega FE, Riegler J, Madison DV, Krasnow MA. Oxygen regulation of breathing through an olfactory receptor activated by lactate. *Nature*. 2015 Nov 12;527(7577):240–4.

63. Zhou T, Chien M-S, Kaleem S, Matsunami H. Single cell transcriptome analysis of mouse carotid body glomus cells. *J Physiol.* 2016 01;594(15):4225–51.
64. Gao L, Bonilla-Henao V, García-Flores P, Arias-Mayenco I, Ortega-Sáenz P, López-Barneo J. Gene expression analyses reveal metabolic specifications in acute O₂ -sensing chemoreceptor cells. *J Physiol.* 2017 Sep 15;595(18):6091–120.
65. Williams BA, Buckler KJ. Biophysical properties and metabolic regulation of a TASK-like potassium channel in rat carotid body type 1 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 Jan;286(1):L221-230.
66. Varas R, Wyatt CN, Buckler KJ. Modulation of TASK-like background potassium channels in rat arterial chemoreceptor cells by intracellular ATP and other nucleotides. *J Physiol.* 2007 Sep 1;583(Pt 2):521–36.
67. Evans AM, Mustard KJW, Wyatt CN, Peers C, Dipp M, Kumar P, et al. Does AMP-activated protein kinase couple inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by hypoxia to calcium signaling in O₂-sensing cells? *J Biol Chem.* 2005 Dec 16;280(50):41504–11.
68. Evans AM, Mahmoud AD, Moral-Sanz J, Hartmann S. The emerging role of AMPK in the regulation of breathing and oxygen supply. *Biochem J.* 2016 01;473(17):2561–72.
69. Mahmoud AD, Lewis S, Juričić L, Udoh U-A, Hartmann S, Jansen MA, et al. AMP-activated Protein Kinase Deficiency Blocks the Hypoxic Ventilatory Response and Thus Precipitates Hypoventilation and Apnea. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016 01;193(9):1032–43.
70. Fernández-Agüera MC, Gao L, González-Rodríguez P, Pintado CO, Arias-Mayenco I, García-Flores P, et al. Oxygen Sensing by Arterial Chemoreceptors Depends on Mitochondrial Complex I Signaling. *Cell Metab.* 2015 Nov 3;22(5):825–37.
71. Gao L, González-Rodríguez P, Ortega-Sáenz P, López-Barneo J. Redox signaling in acute oxygen sensing. *Redox Biol.* 2017;12:908–15.
72. Wyatt CN, Buckler KJ. The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells. *J Physiol.* 2004 Apr 1;556(Pt 1):175–91.
73. Gonzalez C, Agapito MT, Rocher A, Gomez-Niño A, Rigual R, Castañeda J, et al. A revisit to O₂ sensing and transduction in the carotid body chemoreceptors in the context of reactive oxygen species biology. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010 Dec 31;174(3):317–30.
74. Peng Y-J, Nanduri J, Raghuraman G, Souvannakitti D, Gadalla MM, Kumar GK, et al. H₂S mediates O₂ sensing in the carotid body. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jun 8;107(23):10719–24.
75. Kim D, Kim I, Wang J, White C, Carroll JL. Hydrogen sulfide and hypoxia-induced changes in TASK (K₂P_{3/9}) activity and intracellular Ca²⁺ concentration in rat carotid body glomus cells. *Respir Physiol Neurobiol.* 2015 Aug 15;215:30–8.
76. Wang J, Hogan JO, Wang R, White C, Kim D. Role of cystathionine-γ-lyase in hypoxia-induced changes in TASK activity, intracellular [Ca²⁺] and ventilation in mice. *Respir Physiol Neurobiol.* 2017;246:98–106.

77. Prabhakar NR, Semenza GL. Regulation of carotid body oxygen sensing by hypoxia-inducible factors. *Pflugers Arch.* 2016 Jan;468(1):71–5.
78. Rigual R, Iñiguez C, Carreres J, Gonzalez C. Carbonic anhydrase in the carotid body and the carotid sinus nerve. *Histochemistry.* 1985;82(6):577–80.
79. Rocher A, Obeso A, Gonzalez C, Herreros B. Ionic mechanisms for the transduction of acidic stimuli in rabbit carotid body glomus cells. *J Physiol.* 1991 Feb;433:533–48.
80. Buckler KJ, Vaughan-Jones RD. Effects of acidic stimuli on intracellular calcium in isolated type I cells of the neonatal rat carotid body. *Pflugers Arch.* 1993 Oct;425(1–2):22–7.
81. Buckler KJ, Vaughan-Jones RD. Effects of hypercapnia on membrane potential and intracellular calcium in rat carotid body type I cells. *J Physiol.* 1994 Jul 1;478 (Pt 1):157–71.
82. Dasso LL, Buckler KJ, Vaughan-Jones RD. Interactions between hypoxia and hypercapnic acidosis on calcium signaling in carotid body type I cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2000 Jul;279(1):L36–42.
83. Leonard EM, Salman S, Nurse CA. Sensory Processing and Integration at the Carotid Body Tripartite Synapse: Neurotransmitter Functions and Effects of Chronic Hypoxia. *Front Physiol.* 2018;9:225.
84. Conde SV, Monteiro EC, Rigual R, Obeso A, Gonzalez C. Hypoxic intensity: a determinant for the contribution of ATP and adenosine to the genesis of carotid body chemosensory activity. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2012 Jun;112(12):2002–10.
85. Nurse CA. Neurotransmission and neuromodulation in the chemosensory carotid body. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2005 Jun 15;120(1–2):1–9.
86. Iturriaga R, Alcayaga J. Neurotransmission in the carotid body: transmitters and modulators between glomus cells and petrosal ganglion nerve terminals. *Brain Res Brain Res Rev.* 2004 Dec;47(1–3):46–53.
87. Zhong H, Zhang M, Nurse CA. Electrophysiological characterization of 5-HT receptors on rat petrosal neurons in dissociated cell culture. *Brain Res.* 1999 Jan 23;816(2):544–53.
88. Alcayaga J, Varas R, Arroyo J, Iturriaga R, Zapata P. Dopamine modulates carotid nerve responses induced by acetylcholine on the cat petrosal ganglion *in vitro*. *Brain Res.* 1999 Jun 12;831(1–2):97–103.
89. Iturriaga R, Alcayaga J, Gonzalez C. Neurotransmitters in carotid body function: the case of dopamine—invited article. *Adv Exp Med Biol.* 2009;648:137–43.
90. Nurse CA. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms at peripheral arterial chemoreceptors. *Exp Physiol.* 2010 Jun;95(6):657–67.
91. Zhang M, Zhong H, Vollmer C, Nurse CA. Co-release of ATP and ACh mediates hypoxic signalling at rat carotid body chemoreceptors. *J Physiol.* 2000 May 15;525 Pt 1:143–58.
92. Prasad M, Fearon IM, Zhang M, Laing M, Vollmer C, Nurse CA. Expression of P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat carotid body afferent neurones: role in chemosensory signalling. *J Physiol.* 2001 Dec 15;537(Pt 3):667–77.

93. Rong W, Gourine AV, Cockayne DA, Xiang Z, Ford APDW, Spyer KM, et al. Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2003 Dec 10;23(36):11315–21.
94. Buttigieg J, Nurse CA. Detection of hypoxia-evoked ATP release from chemoreceptor cells of the rat carotid body. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Sep 10;322(1):82–7.
95. He L, Chen J, Dinger B, Stensaas L, Fidone S. Effect of chronic hypoxia on purinergic synaptic transmission in rat carotid body. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2006 Jan;100(1):157–62.
96. Reyes EP, Fernández R, Larraín C, Zapata P. Effects of combined cholinergic-purinergic block upon cat carotid body chemoreceptors *in vitro*. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007 Apr 16;156(1):17–22.
97. Niane LM, Donnelly DF, Joseph V, Bairam A. Ventilatory and carotid body chemoreceptor responses to purinergic P2X receptor antagonists in newborn rats. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2011 Jan;110(1):83–94.
98. Zapata P. Is ATP a suitable co-transmitter in carotid body arterial chemoreceptors? *Respir Physiol Neurobiol*. 2007 Jul 1;157(1):106–15.
99. Leonard EM, Salman S, Nurse CA. Sensory Processing and Integration at the Carotid Body Tripartite Synapse: Neurotransmitter Functions and Effects of Chronic Hypoxia. *Front Physiol*. 2018;9:225.
100. Zhang M, Vollmer C, Nurse CA. Adenosine and dopamine oppositely modulate a hyperpolarization-activated current Ih in chemosensory neurons of the rat carotid body in co-culture. *J Physiol*. 2018 Aug;596(15):3101–17.
101. Conde SV, Obeso A, Vicario I, Rigual R, Rocher A, Gonzalez C. Caffeine inhibition of rat carotid body chemoreceptors is mediated by A2A and A2B adenosine receptors. *J Neurochem*. 2006 Jul;98(2):616–28.
102. Conde SV, Monteiro EC. Hypoxia induces adenosine release from the rat carotid body. *J Neurochem*. 2004 Jun;89(5):1148–56.
103. Holmes AP, Ray CJ, Pearson SA, Coney AM, Kumar P. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulates peripheral chemoreceptor activity and cardiorespiratory responses to hypoxia. *J Physiol*. 2018 Aug;596(15):3137–48.
104. Nurse CA, Zhang M. Acetylcholine contributes to hypoxic chemotransmission in co-cultures of rat type 1 cells and petrosal neurons. *Respir Physiol*. 1999 Apr 1;115(2):189–99.
105. Gauda EB. Gene expression in peripheral arterial chemoreceptors. *Microsc Res Tech*. 2002 Nov 1;59(3):153–67.
106. Zhang M, Nurse CA. CO₂/pH chemosensory signaling in co-cultures of rat carotid body receptors and petrosal neurons: role of ATP and ACh. *J Neurophysiol*. 2004 Dec;92(6):3433–45.
107. Shirahata M, Balbir A, Otsubo T, Fitzgerald RS. Role of acetylcholine in neurotransmission of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007 Jul 1;157(1):93–105.

108. Káhlín J, Mkrтчian S, Ebberyd A, Hammarstedt-Nordenvall L, Nordlander B, Yoshitake T, et al. The human carotid body releases acetylcholine, ATP and cytokines during hypoxia. *Exp Physiol*. 2014 Aug;99(8):1089–98.
109. Benot AR, López-Barneo J. Feedback Inhibition of Ca²⁺ Currents by Dopamine in Glomus Cells of the Carotid Body. *Eur J Neurosci*. 1990;2(9):809–12.
110. Donnelly DF. Does catecholamine secretion mediate the hypoxia-induced increase in nerve activity? *Biol Signals*. 1995 Oct;4(5):304–9.
111. Donnelly DF. Chemoreceptor nerve excitation may not be proportional to catecholamine secretion. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1996 Aug;81(2):657–64.
112. López-Barneo J, Ortega-Sáenz P, González-Rodríguez P, Fernández-Agüera MC, Macías D, Pardal R, et al. Oxygen-sensing by arterial chemoreceptors: Mechanisms and medical translation. *Mol Aspects Med*. 2016 Mar;47–48:90–108.
113. Iturriaga R. Translating carotid body function into clinical medicine. *J Physiol*. 2018 Aug;596(15):3067–77.
114. Iturriaga R. Carotid Body Ablation: a New Target to Address Central Autonomic Dysfunction. *Curr Hypertens Rep*. 2018 May 22;20(6):53.
115. Abdala AP, McBryde FD, Marina N, Hendy EB, Engelman ZJ, Fudim M, et al. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. *J Physiol*. 2012 Sep 1;590(17):4269–77.
116. Del Rio R, Marcus NJ, Schultz HD. Carotid chemoreceptor ablation improves survival in heart failure: rescuing autonomic control of cardiorespiratory function. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Dec 24;62(25):2422–30.
117. Marcus NJ, Del Rio R, Schultz EP, Xia X-H, Schultz HD. Carotid body denervation improves autonomic and cardiac function and attenuates disordered breathing in congestive heart failure. *J Physiol*. 2014 Jan 15;592(2):391–408.
118. Ribeiro MJ, Sacramento JF, Gonzalez C, Guarino MP, Monteiro EC, Conde SV. Carotid body denervation prevents the development of insulin resistance and hypertension induced by hypercaloric diets. *Diabetes*. 2013 Aug;62(8):2905–16.
119. Sacramento JF, Ribeiro MJ, Rodrigues T, Olea E, Melo BF, Guarino MP, et al. Functional abolition of carotid body activity restores insulin action and glucose homeostasis in rats: key roles for visceral adipose tissue and the liver. *Diabetologia*. 2017;60(1):158–68.
120. Del Rio R, Andrade DC, Lucero C, Arias P, Iturriaga R. Carotid Body Ablation Abrogates Hypertension and Autonomic Alterations Induced by Intermittent Hypoxia in Rats. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2016;68(2):436–45.
121. Schwenke DO, Cragg PA. Carotid bodies and the sigh reflex in the conscious and anaesthetised guinea-pig. *Adv Exp Med Biol*. 2000;475:801–13.
122. Curran AK, O'Halloran KD, Bradford A. Effects of superior laryngeal nerve section on ventilation in neonatal guinea-pigs. *Respir Physiol*. 1995 Jul;101(1):23–9.
123. Yilmaz C, Hogg DC, Ravikumar P, Hsia CCW. Ventilatory acclimatization in awake guinea pigs raised at high altitude. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005 Feb 15;145(2–3):235–42.

124. Cragg PA, Schwenke DO. Role of carotid bodies in the guinea-pig. *Adv Exp Med Biol.* 1996;410:377–81.
125. Alarie Y, Stock MF. Arterial blood gas measurements in guinea pigs and inspired CO₂ concentrations for ventilatory performance challenges. *Fundam Appl Toxicol Off J Soc Toxicol.* 1988 Aug;11(2):268–76.
126. Guyenet PG, Bayliss DA. Neural Control of Breathing and CO₂ Homeostasis. *Neuron.* 2015 Sep 2;87(5):946–61.
127. Fernández R, Arriagada I, Garrido A-M, Larraín C, Zapata P. Ventilatory chemosensory drive in cats, rats and guinea-pigs. *Adv Exp Med Biol.* 2003;536:489–95.
128. Turek Z, Ringnalda BE, Morán O, Kreuzer F. Oxygen transport in guinea pigs native to high altitude (Junin, Peru, 4,105 m). *Pflugers Arch.* 1980 Mar;384(2):109–15.
129. Gonzalez-Obeso E, Docio I, Olea E, Cogolludo A, Obeso A, Rocher A, et al. Guinea Pig Oxygen-Sensing and Carotid Body Functional Properties. *Front Physiol.* 2017;8:285.
130. Laidler P, Kay JM. A quantitative morphological study of the carotid bodies of rats living at a simulated altitude of 4300 metres. *J Pathol.* 1975 Nov;117(3):183–91.
131. Del Rio R, Muñoz C, Arias P, Court FA, Moya EA, Iturriaga R. Chronic intermittent hypoxia-induced vascular enlargement and VEGF upregulation in the rat carotid body is not prevented by antioxidant treatment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2011 Nov;301(5):L702-711.
132. Wang Z-Y, Bisgard GE. Chronic hypoxia-induced morphological and neurochemical changes in the carotid body. *Microsc Res Tech.* 2002 Nov 1;59(3):168–77.
133. Tipoe GL, Fung M-L. Expression of HIF-1alpha, VEGF and VEGF receptors in the carotid body of chronically hypoxic rat. *Respir Physiol Neurobiol.* 2003 Nov 14;138(2–3):143–54.
134. Olea E, Ferrer E, Prieto-Lloret J, Gonzalez-Martin C, Vega-Agapito V, Gonzalez-Obeso E, et al. Effects of cigarette smoke and chronic hypoxia on ventilation in guinea pigs. Clinical significance. *Adv Exp Med Biol.* 2012;758:325–32.
135. Semenza GL. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol.* 2006 Sep;91(5):803–6.
136. Sekhon H, Sun JP, Churg A, Wright J. Pulmonary capillaries are smaller in the centre than in the periphery of the guinea-pig lung lobule: possible contributory mechanism for the centrilobular location of emphysema? *Int J Exp Pathol.* 1995 Apr;76(2):145–8.
137. Rocher A, Geijo-Barrientos E, Cáceres AI, Rigual R, González C, Almaraz L. Role of voltage-dependent calcium channels in stimulus-secretion coupling in rabbit carotid body chemoreceptor cells. *J Physiol.* 2005 Jan 15;562(Pt 2):407–20.
138. Guilleminault C, Tilkian A, Dement WC. The sleep apnea syndromes. *Annu Rev Med.* 1976;27:465–84.
139. Block AJ, Boysen PG, Wynne JW, Hunt LA. Sleep apnea, hypopnea and oxygen desaturation in normal subjects. A strong male predominance. *N Engl J Med.* 1979 Mar 8;300(10):513–7.

140. Gould GA, Whyte KF, Rhind GB, Airlie MA, Catterall JR, Shapiro CM, et al. The sleep hypopnea syndrome. *Am Rev Respir Dis.* 1988 Apr;137(4):895–8.
141. Sullivan CE, Issa FG, Berthon-Jones M, Eves L. Reversal of obstructive sleep apnoea by continuous positive airway pressure applied through the nares. *Lancet Lond Engl.* 1981 Apr 18;1(8225):862–5.
142. Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *N Engl J Med.* 1993 Apr 29;328(17):1230–5.
143. Canal JMM, Cuesta FJP. *Patología básica del sueño.* Elsevier España; 2015. pp. 13-20.
144. Stradling JR, Chadwick GA, Frew AJ. Changes in ventilation and its components in normal subjects during sleep. *Thorax.* 1985 May;40(5):364–70.
145. Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol Rev.* 2010 Jan;90(1):47–112.
146. Wiegand DA, Latz B, Zwillich CW, Wiegand L. Geniohyoid muscle activity in normal men during wakefulness and sleep. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1990 Oct;69(4):1262–9.
147. Morrison DL, Launois SH, Isono S, Feroah TR, Whitelaw WA, Remmers JE. Pharyngeal narrowing and closing pressures in patients with obstructive sleep apnea. *Am Rev Respir Dis.* 1993 Sep;148(3):606–11.
148. Eisele DW, Schwartz AR, Smith PL. Tongue neuromuscular and direct hypoglossal nerve stimulation for obstructive sleep apnea. *Otolaryngol Clin North Am.* 2003 Jun;36(3):501–10.
149. Lévy P, Kohler M, McNicholas WT, Barbé F, McEvoy RD, Somers VK, et al. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nat Rev Dis Primer.* 2015 25;1:15015.
150. Ho ML, Brass SD. Obstructive sleep apnea. *Neurol Int.* 2011 Nov 29;3(3):e15.
151. Young T, Peppard PE, Gottlieb DJ. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 May 1;165(9):1217–39.
152. Butt M, Dwivedi G, Khair O, Lip GYH. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *Int J Cardiol.* 2010 Feb 18;139(1):7–16.
153. Gozal D, Kheirandish-Gozal L, Bhattacharjee R, Spruyt K. Neurocognitive and endothelial dysfunction in children with obstructive sleep apnea. *Pediatrics.* 2010 Nov;126(5):e1161-1167.
154. Canessa N, Castronovo V, Cappa SF, Aloia MS, Marelli S, Falini A, et al. Obstructive sleep apnea: brain structural changes and neurocognitive function before and after treatment. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 May 15;183(10):1419–26.
155. Peker Y, Hedner J, Norum J, Kraiczi H, Carlson J. Increased incidence of cardiovascular disease in middle-aged men with obstructive sleep apnea: a 7-year follow-up. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Jul 15;166(2):159–65.
156. Gottlieb DJ, Yenokyan G, Newman AB, O'Connor GT, Punjabi NM, Quan SF, et al. Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure: the sleep heart health study. *Circulation.* 2010 Jul 27;122(4):352–60.

157. Lévy P, Bonsignore MR, Eckel J. Sleep, sleep-disordered breathing and metabolic consequences. *Eur Respir J*. 2009 Jul;34(1):243–60.
158. Durán-Cantolla J. [New directions in the diagnosis of sleep apnea-hypopnea syndrome]. *Arch Bronconeumol*. 2005 Dec;41(12):645–8.
159. Chiang AA. Obstructive sleep apnea and chronic intermittent hypoxia: a review. *Chin J Physiol*. 2006 Oct 31;49(5):234–43.
160. Durán J, Esnaola S, Rubio R, Iztueta A. Obstructive sleep apnea-hypopnea and related clinical features in a population-based sample of subjects aged 30 to 70 yr. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001 Mar;163(3 Pt 1):685–9.
161. Punjabi NM. The epidemiology of adult obstructive sleep apnea. *Proc Am Thorac Soc*. 2008 Feb 15;5(2):136–43.
162. Ali NJ, Pitson DJ, Stradling JR. Snoring, sleep disturbance, and behaviour in 4-5 year olds. *Arch Dis Child*. 1993 Mar;68(3):360–6.
163. Terán-Santos J, Jiménez-Gómez A, Cordero-Guevara J. The association between sleep apnea and the risk of traffic accidents. Cooperative Group Burgos-Santander. *N Engl J Med*. 1999 Mar 18;340(11):847–51.
164. Martínez-García MA, Durán-Cantolla J, Montserrat JM. [Sleep apnea-hypopnea syndrome in the elderly]. *Arch Bronconeumol*. 2010 Sep;46(9):479–88.
165. Kyzer S, Charuzi I. Obstructive sleep apnea in the obese. *World J Surg*. 1998 Sep;22(9):998–1001.
166. Berger S, Lavie L. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disease and hypoxia--potential implications to obstructive sleep apnea. *Transl Res J Lab Clin Med*. 2011 Jul;158(1):1–13.
167. Tsai Y-J, Ramar K, Liang Y-J, Chiu P-H, Powell N, Chi C-Y, et al. Peripheral neuropathology of the upper airway in obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep Med Rev*. 2013 Apr;17(2):161–8.
168. Young T, Skatrud J, Peppard PE. Risk factors for obstructive sleep apnea in adults. *JAMA*. 2004 Apr 28;291(16):2013–6.
169. Leung RST, Comondore VR, Ryan CM, Stevens D. Mechanisms of sleep-disordered breathing: causes and consequences. *Pflugers Arch*. 2012 Jan;463(1):213–30.
170. Sateia MJ. International classification of sleep disorders-third edition: highlights and modifications. *Chest*. 2014 Nov;146(5):1387–94.
171. Pérez P. Equipos más ligeros para tratar la apnea del sueño. www.larazon.es. 2017. Available from: <https://www.larazon.es/atusalud/salud/equipos-mas-ligeros-para-tratar-la-apnea-del-sueno-JP17184508>
172. Engleman HM, Cheshire KE, Deary IJ, Douglas NJ. Daytime sleepiness, cognitive performance and mood after continuous positive airway pressure for the sleep apnoea/hypopnoea syndrome. *Thorax*. 1993 Sep;48(9):911–4.

173. Narkiewicz K, Kato M, Phillips BG, Pesek CA, Davison DE, Somers VK. Nocturnal continuous positive airway pressure decreases daytime sympathetic traffic in obstructive sleep apnea. *Circulation*. 1999 Dec 7;100(23):2332–5.
174. Chokroverty S, Billiard M. *Sleep Medicine: A Comprehensive Guide to Its Development, Clinical Milestones, and Advances in Treatment*. Springer; 2015. 552 p.
175. Riley RW, Powell NB, Guilleminault C. Obstructive sleep apnea syndrome: a surgical protocol for dynamic upper airway reconstruction. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. 1993 Jul;51(7):742-747-749.
176. Gami AS, Olson EJ, Shen WK, Wright RS, Ballman KV, Hodge DO, et al. Obstructive sleep apnea and the risk of sudden cardiac death: a longitudinal study of 10,701 adults. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Aug 13;62(7):610–6.
177. Fletcher EC, Lesske J, Qian W, Miller CC, Unger T. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1992 Jun;19(6 Pt 1):555–61.
178. Lattimore J-DL, Celermajor DS, Wilcox I. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003 May 7;41(9):1429–37.
179. Peng Y-J, Prabhakar NR. Effect of two paradigms of chronic intermittent hypoxia on carotid body sensory activity. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2004 Mar;96(3):1236–1242; discussion 1196.
180. Gonzalez-Martín MC, Vega-Agapito MV, Conde SV, Castañeda J, Bustamante R, Olea E, et al. Carotid body function and ventilatory responses in intermittent hypoxia. Evidence for anomalous brainstem integration of arterial chemoreceptor input. *J Cell Physiol*. 2011 Aug;226(8):1961–9.
181. Kumar GK, Nanduri J, Peng Y-J, Prabhakar NR. Neuromolecular mechanisms mediating the effects of chronic intermittent hypoxia on adrenal medulla. *Respir Physiol Neurobiol*. 2015 Apr;209:115–9.
182. Jelic S, Padeletti M, Kawut SM, Higgins C, Canfield SM, Onat D, et al. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation*. 2008 Apr 29;117(17):2270–8.
183. Quintero M, Gonzalez-Martin M del C, Vega-Agapito V, Gonzalez C, Obeso A, Farré R, et al. The effects of intermittent hypoxia on redox status, NF-κB activation, and plasma lipid levels are dependent on the lowest oxygen saturation. *Free Radic Biol Med*. 2013 Dec;65:1143–54.
184. Gonzalez C, Yubero S, Gomez-Niño MA, Agapito T, Rocher A, Rigual R, et al. Some reflections on intermittent hypoxia. Does it constitute the translational niche for carotid body chemoreceptor researchers? *Adv Exp Med Biol*. 2012;758:333–42.
185. Troncoso Brindeiro CM, da Silva AQ, Allahdadi KJ, Youngblood V, Kanagy NL. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007 Nov;293(5):H2971-2976.
186. Zoccal DB, Bonagamba LGH, Oliveira FRT, Antunes-Rodrigues J, Machado BH. Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol*. 2007 Jan;92(1):79–85.

187. Lévy P, Ryan S, Oldenburg O, Parati G. Sleep apnoea and the heart. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc.* 2013 Sep 1;22(129):333–52.
188. Terán Santos J, Alonso Alvarez ML, Cordero Guevara J, Ayuela Azcárate JM, Monserrat Canal JM. [Sleep apnea-hypopnea syndrome and the heart]. *Rev Esp Cardiol.* 2006 Jul;59(7):718–24.
189. Iturriaga R, Del Rio R, Idiaquez J, Somers VK. Carotid body chemoreceptors, sympathetic neural activation, and cardiometabolic disease. *Biol Res.* 2016 Feb 26;49:13.
190. Prabhakar NR, Peng Y-J, Kumar GK, Nanduri J. Peripheral chemoreception and arterial pressure responses to intermittent hypoxia. *Compr Physiol.* 2015 Apr;5(2):561–77.
191. Peng Y-J, Overholt JL, Kline D, Kumar GK, Prabhakar NR. Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Aug 19;100(17):10073–8.
192. Somers VK, Dyken ME, Clary MP, Abboud FM. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J Clin Invest.* 1995 Oct;96(4):1897–904.
193. Lesske J, Fletcher EC, Bao G, Unger T. Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia--influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system. *J Hypertens.* 1997 Dec;15(12 Pt 2):1593–603.
194. Prabhakar NR, Peng Y-J, Jacono FJ, Kumar GK, Dick TE. Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005 Jun;32(5–6):447–9.
195. McBryde FD, Abdala AP, Hendy EB, Pijacka W, Marvar P, Moraes DJA, et al. The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nat Commun.* 2013;4:2395.
196. Kara T, Narkiewicz K, Somers VK. Chemoreflexes--physiology and clinical implications. *Acta Physiol Scand.* 2003 Mar;177(3):377–84.
197. Del Rio R, Moya EA, Iturriaga R. Differential expression of pro-inflammatory cytokines, endothelin-1 and nitric oxide synthases in the rat carotid body exposed to intermittent hypoxia. *Brain Res.* 2011 Jun 13;1395:74–85.
198. Prabhakar NR. Carotid body chemoreflex: a driver of autonomic abnormalities in sleep apnoea. *Exp Physiol.* 2016 01;101(8):975–85.
199. Nanduri J, Peng Y-J, Yuan G, Kumar GK, Prabhakar NR. Hypoxia-inducible factors and hypertension: lessons from sleep apnea syndrome. *J Mol Med Berl Ger.* 2015 May;93(5):473–80.
200. Bao G, Metreveli N, Li R, Taylor A, Fletcher EC. Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: role of the sympathetic nervous system. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 1997 Jul;83(1):95–101.
201. Fletcher EC, Lesske J, Culman J, Miller CC, Unger T. Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation in episodic hypoxia. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1992 Nov;20(5):612–9.

202. Peng Y-J, Yuan G, Khan S, Nanduri J, Makarenko VV, Reddy VD, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor- α isoforms and redox state by carotid body neural activity in rats. *J Physiol*. 2014 Sep 1;592(17):3841–58.
203. Prabhakar NR, Peng Y-J, Yuan G, Kumar GK. Reactive oxygen species facilitate oxygen sensing. *Novartis Found Symp*. 2006;272:95-99-105, 131–40.
204. Pialoux V, Foster GE, Ahmed SB, Beaudin AE, Hanly PJ, Poulin MJ. Losartan abolishes oxidative stress induced by intermittent hypoxia in humans. *J Physiol*. 2011 Nov 15;589(Pt 22):5529–37.
205. Lai CJ, Yang CCH, Hsu YY, Lin YN, Kuo TBJ. Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2006 Jun;100(6):1974–82.
206. Nanduri J, Vaddi DR, Khan SA, Wang N, Makarenko V, Prabhakar NR. Xanthine oxidase mediates hypoxia-inducible factor-2 α degradation by intermittent hypoxia. *PloS One*. 2013;8(10):e75838.
207. Prabhakar NR, Semenza GL. Oxygen Sensing and Homeostasis. *Physiol Bethesda Md*. 2015 Sep;30(5):340–8.
208. Lam S-Y, Tipoe GL, Liong EC, Fung M-L. Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and endothelin-1 expression in the rat carotid body during intermittent hypoxia. *Adv Exp Med Biol*. 2006;580:21-27-359.
209. Nanduri J, Wang N, Yuan G, Khan SA, Souvannakitti D, Peng Y-J, et al. Intermittent hypoxia degrades HIF-2 α via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jan 27;106(4):1199–204.
210. Peng Y-J, Nanduri J, Yuan G, Wang N, Deneris E, Pendyala S, et al. NADPH oxidase is required for the sensory plasticity of the carotid body by chronic intermittent hypoxia. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2009 Apr 15;29(15):4903–10.
211. Khan SA, Nanduri J, Yuan G, Kinsman B, Kumar GK, Joseph J, et al. NADPH oxidase 2 mediates intermittent hypoxia-induced mitochondrial complex I inhibition: relevance to blood pressure changes in rats. *Antioxid Redox Signal*. 2011 Feb 15;14(4):533–42.
212. Yuan G, Khan SA, Luo W, Nanduri J, Semenza GL, Prabhakar NR. Hypoxia-inducible factor 1 mediates increased expression of NADPH oxidase-2 in response to intermittent hypoxia. *J Cell Physiol*. 2011 Nov;226(11):2925–33.
213. Rey S, Corthorn J, Chacón C, Iturriaga R. Expression and immunolocalization of endothelin peptides and its receptors, ETA and ETB, in the carotid body exposed to chronic intermittent hypoxia. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc*. 2007 Feb;55(2):167–74.
214. Rey S, Del Rio R, Iturriaga R. Contribution of endothelin-1 and endothelin A and B receptors to the enhanced carotid body chemosensory responses induced by chronic intermittent hypoxia. *Adv Exp Med Biol*. 2008;605:228–32.
215. Peng Y-J, Nanduri J, Raghuraman G, Wang N, Kumar GK, Prabhakar NR. Role of oxidative stress-induced endothelin-converting enzyme activity in the alteration of carotid body function by chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol*. 2013 Nov;98(11):1620–30.

216. Peng Y-J, Nanduri J, Zhang X, Wang N, Raghuraman G, Seagard J, et al. Endothelin-1 mediates attenuated carotid baroreceptor activity by intermittent hypoxia. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2012 Jan;112(1):187–96.
217. Iturriaga R, Moya EA, Del Rio R. Inflammation and oxidative stress during intermittent hypoxia: the impact on chemoreception. *Exp Physiol*. 2015 Feb 1;100(2):149–55.
218. Lam S-Y, Liu Y, Ng K-M, Liong EC, Tipoe GL, Leung PS, et al. Upregulation of a local renin-angiotensin system in the rat carotid body during chronic intermittent hypoxia. *Exp Physiol*. 2014 Jan;99(1):220–31.
219. Peng Y-J, Makarenko VV, Nanduri J, Vasavda C, Raghuraman G, Yuan G, et al. Inherent variations in CO-H₂S-mediated carotid body O₂ sensing mediate hypertension and pulmonary edema. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Jan 21;111(3):1174–9.
220. Peng Y-J, Zhang X, Gridina A, Chupikova I, McCormick DL, Thomas RJ, et al. Complementary roles of gasotransmitters CO and H₂S in sleep apnea. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 07;114(6):1413–8.
221. Almendros I, Wang Y, Gozal D. The polymorphic and contradictory aspects of intermittent hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2014 Jul 15;307(2):L129-140.
222. Fava C, Montagnana M, Favalaro EJ, Guidi GC, Lippi G. Obstructive sleep apnea syndrome and cardiovascular diseases. *Semin Thromb Hemost*. 2011 Apr;37(3):280–97.
223. Galán A, Formiguera X, Rey-Joly C. [Asymmetric dimethylarginine as cardiovascular risk factor]. *Med Clin (Barc)*. 2008 Sep 6;131(7):271–5.
224. Kasai T. Sleep apnea and heart failure. *J Cardiol*. 2012 Aug;60(2):78–85.
225. Ryan S, Taylor CT, McNicholas WT. Systemic inflammation: a key factor in the pathogenesis of cardiovascular complications in obstructive sleep apnoea syndrome? *Postgrad Med J*. 2009 Dec;85(1010):693–8.
226. Prabhakar NR, Kumar GK, Nanduri J, Semenza GL. ROS signaling in systemic and cellular responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Sep;9(9):1397–403.
227. Grebe M, Eisele HJ, Weissmann N, Schaefer C, Tillmanns H, Seeger W, et al. Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Apr 15;173(8):897–901.
228. Górlach A, Bonello S. The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem J*. 2008 Jun 15;412(3):e17-19.
229. Wang T, Zhang X, Li JJ. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol*. 2002 Oct;2(11):1509–20.
230. Bosc LVG, Resta T, Walker B, Kanagy NL. Mechanisms of intermittent hypoxia induced hypertension. *J Cell Mol Med*. 2010 Jan;14(1–2):3–17.
231. Kritchevsky SB, Cesari M, Pahor M. Inflammatory markers and cardiovascular health in older adults. *Cardiovasc Res*. 2005 May 1;66(2):265–75.

232. Atkeson A, Yeh SY, Malhotra A, Jelic S. Endothelial function in obstructive sleep apnea. *Prog Cardiovasc Dis*. 2009 Apr;51(5):351–62.
233. Yokoe T, Minoguchi K, Matsuo H, Oda N, Minoguchi H, Yoshino G, et al. Elevated levels of C-reactive protein and interleukin-6 in patients with obstructive sleep apnea syndrome are decreased by nasal continuous positive airway pressure. *Circulation*. 2003 Mar 4;107(8):1129–34.
234. Kent BD, Ryan S, McNicholas WT. Obstructive sleep apnea and inflammation: relationship to cardiovascular co-morbidity. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011 Sep 30;178(3):475–81.
235. Bouloukaki I, Mermigkis C, Kallergis EM, Moniaki V, Mauroudi E, Schiza SE. Obstructive sleep apnea syndrome and cardiovascular disease: The influence of C-reactive protein. *World J Exp Med*. 2015 May 20;5(2):77–83.
236. Savransky V, Nanayakkara A, Li J, Bevans S, Smith PL, Rodriguez A, et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Jun 15;175(12):1290–7.
237. Lavie L, Vishnevsky A, Lavie P. Evidence for lipid peroxidation in obstructive sleep apnea. *Sleep*. 2004 Feb 1;27(1):123–8.
238. Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J*. 2003 Apr;79(930):195-199-200.
239. Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*. 2005 Jan;23(1):7–17.
240. Zhang W-Z, Venardos K, Finch S, Kaye DM. Detrimental effect of oxidized LDL on endothelial arginine metabolism and transportation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(5):920–8.
241. Leeman M, de Beyl VZ, Biarent D, Maggiorini M, Mélot C, Naeije R. Inhibition of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in hypoxic vasoconstriction and oleic acid-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 May;159(5 Pt 1):1383–90.
242. Ip MS, Lam B, Chan LY, Zheng L, Tsang KW, Fung PC, et al. Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 Dec;162(6):2166–71.
243. Schulz R, Schmidt D, Blum A, Lopes-Ribeiro X, Lücke C, Mayer K, et al. Decreased plasma levels of nitric oxide derivatives in obstructive sleep apnoea: response to CPAP therapy. *Thorax*. 2000 Dec;55(12):1046–51.
244. Coulet F, Nadaud S, Agrapart M, Soubrier F. Identification of hypoxia-response element in the human endothelial nitric-oxide synthase gene promoter. *J Biol Chem*. 2003 Nov 21;278(47):46230–40.
245. Sirker A, Zhang M, Shah AM. NADPH oxidases in cardiovascular disease: insights from *in vivo* models and clinical studies. *Basic Res Cardiol*. 2011 Sep;106(5):735–47.
246. Gonzalez C, Agapito MT, Rocher A, Gonzalez-Martin MC, Vega-Agapito V, Gomez-Niño A, et al. Chemoreception in the context of the general biology of ROS. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007 Jul 1;157(1):30–44.

247. Jelic S, Lederer DJ, Adams T, Padeletti M, Colombo PC, Factor PH, et al. Vascular inflammation in obesity and sleep apnea. *Circulation*. 2010 Mar 2;121(8):1014–21.
248. Carlson JT, Rångemark C, Hedner JA. Attenuated endothelium-dependent vascular relaxation in patients with sleep apnoea. *J Hypertens*. 1996 May;14(5):577–84.
249. Böger RH. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the 'L-arginine paradox' and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J Nutr*. 2004 Oct;134(10 Suppl):2842S–2847S; discussion 2853S.
250. Ohike Y, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Kojima T, Ohga E, et al. Amelioration of vascular endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea syndrome by nasal continuous positive airway pressure--possible involvement of nitric oxide and asymmetric NG, NG-dimethylarginine. *Circ J Off J Jpn Circ Soc*. 2005 Feb;69(2):221–6.
251. Davids M, Richir MC, Visser M, Ellger B, van den Berghe G, van Leeuwen PAM, et al. Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in regulation of tissue and plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in an animal model of prolonged critical illness. *Metabolism*. 2012 Apr;61(4):482–90.
252. Jia S-J, Jiang D-J, Hu C-P, Zhang X-H, Deng H-W, Li Y-J. Lysophosphatidylcholine-induced elevation of asymmetric dimethylarginine level by the NADPH oxidase pathway in endothelial cells. *Vascul Pharmacol*. 2006 Mar;44(3):143–8.
253. Tain Y-L, Kao Y-H, Hsieh C-S, Chen C-C, Sheen J-M, Lin I-C, et al. Melatonin blocks oxidative stress-induced increased asymmetric dimethylarginine. *Free Radic Biol Med*. 2010 Sep 15;49(6):1088–98.
254. Wang Y, Zhang M, Liu Y, Liu Y, Chen M. The effect of nebivolol on asymmetric dimethylarginine system in spontaneously hypertension rats. *Vascul Pharmacol*. 2011 Feb;54(1–2):36–43.
255. Earley S, Nelin LD, Chicoine LG, Walker BR. Hypoxia-induced pulmonary endothelin-1 expression is unaltered by nitric oxide. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2002 Mar;92(3):1152–8.
256. Gertler JP, Ocasio VH. Endothelin production by hypoxic human endothelium. *J Vasc Surg*. 1993 Aug;18(2):178-182-184.
257. Kagamu H, Suzuki T, Arakawa M, Mitsui Y. Low oxygen enhances endothelin-1 (ET-1) production and responsiveness to ET-1 in cultured cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994 Aug 15;202(3):1612–8.
258. Kaehler J, Sill B, Koester R, Mittmann C, Orzechowski H-D, Muenzel T, et al. Endothelin-1 mRNA and protein in vascular wall cells is increased by reactive oxygen species. *Clin Sci Lond Engl* 1979. 2002 Aug;103 Suppl 48:176S–178S.
259. Allahdadi KJ, Cherng TW, Pai H, Silva AQ, Walker BR, Nelin LD, et al. Endothelin type A receptor antagonist normalizes blood pressure in rats exposed to eucapnic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Jul;295(1):H434-440.
260. Allahdadi KJ, Walker BR, Kanagy NL. Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2005 Apr;45(4):705–9.

261. Brezniceanu M-L, Wei C-C, Zhang S-L, Hsieh T-J, Guo D-F, Hébert M-J, et al. Transforming growth factor-beta 1 stimulates angiotensinogen gene expression in kidney proximal tubular cells. *Kidney Int.* 2006 Jun;69(11):1977–85.
262. Hsieh T-J, Fustier P, Wei C-C, Zhang S-L, Filep JG, Tang S-S, et al. Reactive oxygen species blockade and action of insulin on expression of angiotensinogen gene in proximal tubular cells. *J Endocrinol.* 2004 Dec;183(3):535–50.
263. Hsu Y-H, Chen J-J, Chang N-C, Chen C-H, Liu J-C, Chen T-H, et al. Role of reactive oxygen species-sensitive extracellular signal-regulated kinase pathway in angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression in vascular endothelial cells. *J Vasc Res.* 2004 Feb;41(1):64–74.
264. Knappe D, Sill B, Tharun B, Koester R, Baldus S, Muenzel T, et al. Endothelin-1 in humans is increased by oxygen-derived radicals *ex vivo* and *in vivo*. *J Investig Med Off Publ Am Fed Clin Res.* 2007 Sep;55(6):306–14.
265. Fletcher EC, Bao G, Li R. Renin activity and blood pressure in response to chronic episodic hypoxia. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1999 Aug;34(2):309–14.
266. Takahashi S, Nakamura Y, Nishijima T, Sakurai S, Inoue H. Essential roles of angiotensin II in vascular endothelial growth factor expression in sleep apnea syndrome. *Respir Med.* 2005 Sep;99(9):1125–31.
267. Gjørup PH, Sadauskiene L, Wessels J, Nyvad O, Strunge B, Pedersen EB. Abnormally increased endothelin-1 in plasma during the night in obstructive sleep apnea: relation to blood pressure and severity of disease. *Am J Hypertens.* 2007 Jan;20(1):44–52.
268. Benjamin JA, Moller M, Ebdon P, Bartle I, Lewis KE. Serum angiotensin converting enzyme and the obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *J Clin Sleep Med JCSM Off Publ Am Acad Sleep Med.* 2008 Aug 15;4(4):325–31.
269. Quintero M, Olea E, Conde SV, Obeso A, Gallego-Martin T, Gonzalez C, et al. Age protects from harmful effects produced by chronic intermittent hypoxia. *J Physiol.* 2016 Mar 15;594(6):1773–90.
270. Lavie L, Lavie P. Molecular mechanisms of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *Eur Respir J.* 2009 Jun;33(6):1467–84.
271. Conde SV, Obeso A, Rigual R, Monteiro EC, Gonzalez C. Function of the rat carotid body chemoreceptors in ageing. *J Neurochem.* 2006 Nov;99(3):711–23.
272. Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol Rev.* 2012 Jul;92(3):967–1003.
273. Lavie L, Lavie P. CrossTalk opposing view: Most cardiovascular diseases in sleep apnoea are not caused by sympathetic activation. *J Physiol.* 2012 Jun 15;590(12):2817–2819; discussion 2821.
274. Socha MJ, Boerman EM, Behringer EJ, Shaw RL, Domeier TL, Segal SS. Advanced age protects microvascular endothelium from aberrant Ca(2+) influx and cell death induced by hydrogen peroxide. *J Physiol.* 2015 May 1;593(9):2155–69.

275. Fidone S, Gonzalez C. Catecholamine synthesis in rabbit carotid body *in vitro*. *J Physiol*. 1982 Dec;333:69–79.
276. Peaston RT, Weinkove C. Measurement of catecholamines and their metabolites. *Ann Clin Biochem*. 2004 Jan;41(Pt 1):17–38.
277. Raggi MA, Sabbioni C, Casamenti G, Gerra G, Calonghi N, Masotti L. Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B Biomed Sci App*. 1999 Jul 9;730(2):201–11.
278. Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circ Res*. 1977 Jul;41(1):19–26.
279. Moshage H, Kok B, Huizenga JR, Jansen PL. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation. *Clin Chem*. 1995 Jun;41(6 Pt 1):892–6.
280. Teerlink T. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2007 May 15;851(1–2):21–9.
281. Couplan E, del Mar Gonzalez-Barroso M, Alves-Guerra MC, Ricquier D, Goubern M, Bouillaud F. No evidence for a basal, retinoic, or superoxide-induced uncoupling activity of the uncoupling protein 2 present in spleen or lung mitochondria. *J Biol Chem*. 2002 Jul 19;277(29):26268–75.
282. Pecqueur C, Alves-Guerra MC, Gelly C, Levi-Meyrueis C, Couplan E, Collins S, et al. Uncoupling protein 2, *in vivo* distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J Biol Chem*. 2001 Mar 23;276(12):8705–12.
283. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248–54.
284. Conde SV, Gonzalez C, Batuca JR, Monteiro EC, Obeso A. An antagonistic interaction between A2B adenosine and D2 dopamine receptors modulates the function of rat carotid body chemoreceptor cells. *J Neurochem*. 2008 Dec;107(5):1369–81.
285. Wakai J, Takayama A, Yokoyama T, Nakamuta N, Kusakabe T, Yamamoto Y. Immunohistochemical localization of dopamine D2 receptor in the rat carotid body. *Acta Histochem*. 2015 Oct;117(8):784–9.
286. Rey S, Del Rio R, Alcayaga J, Iturriaga R. Chronic intermittent hypoxia enhances cat chemosensory and ventilatory responses to hypoxia. *J Physiol*. 2004 Oct 15;560(Pt 2):577–86.
287. Nieto FJ, Young TB, Lind BK, Shahar E, Samet JM, Redline S, et al. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study. *JAMA*. 2000 Apr 12;283(14):1829–36.
288. Docio I, Olea E, Prieto-LLoret J, Gallego-Martin T, Obeso A, Gomez-Niño A, et al. Guinea Pig as a Model to Study the Carotid Body Mediated Chronic Intermittent Hypoxia Effects. *Front Physiol*. 2018;9:694.

289. Farré R, Montserrat JM, Gozal D, Almendros I, Navajas D. Intermittent Hypoxia Severity in Animal Models of Sleep Apnea. *Front Physiol* [Internet]. 2018 [cited 2018 Nov 14];9. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2018.01556/full>
290. Sorbini CA, Grassi V, Solinas E, Muiesan G. Arterial oxygen tension in relation to age in healthy subjects. *Respir Int Rev Thorac Dis*. 1968;25(1):3–13.
291. Cerveri I, Zoia MC, Fanfulla F, Spagnolatti L, Berrayah L, Grassi M, et al. Reference values of arterial oxygen tension in the middle-aged and elderly. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995 Sep;152(3):934–41.
292. Gunnarsson L, Tokics L, Brismar B, Hedenstierna G. Influence of age on circulation and arterial blood gases in man. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1996 Feb;40(2):237–43.
293. Knapowski J, Wieczorowska-Tobis K, Witowski J. Pathophysiology of ageing. *J Physiol Pharmacol Off J Pol Physiol Soc*. 2002 Jun;53(2):135–46.
294. Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Johnson RS, et al. Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin *in vivo*. *J Clin Invest*. 2007 Apr;117(4):1068–77.
295. Alfrey CP, Rice L, Udden MM, Driscoll TB. Neocytolysis: physiological down-regulator of red-cell mass. *Lancet Lond Engl*. 1997 May 10;349(9062):1389–90.
296. Risso A, Turello M, Biffoni F, Antonutto G. Red blood cell senescence and neocytolysis in humans after high altitude acclimatization. *Blood Cells Mol Dis*. 2007 Apr;38(2):83–92.
297. Solmaz S, Duksal F, Ganidağlı S. Is obstructive sleep apnoea syndrome really one of the causes of secondary polycythaemia? *Hematol Amst Neth*. 2015 Mar;20(2):108–11.
298. Song J, Sundar K, Gangaraju R, Prchal JT. Regulation of erythropoiesis after normoxic return from chronic sustained and intermittent hypoxia. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2017 01;123(6):1671–5.
299. Feuerstein G, Goldstein DS, Ramwell PW, Zerbe RL, Lux WE, Faden AI, et al. Cardiorespiratory, sympathetic and biochemical responses to T-2 toxin in the guinea pig and rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985 Mar;232(3):786–94.
300. Mover-Lev H, Levy D, Luntz M, Harell M, Ar A, Sadé J. Dependence of middle ear gas composition on pulmonary ventilation. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1997 Apr;106(4):314–9.
301. Schwenke DO, Cragg PA. Comparison of the depressive effects of four anesthetic regimens on ventilatory and cardiovascular variables in the guinea pig. *Comp Med*. 2004 Feb;54(1):77–85.
302. Kline DD. Chronic intermittent hypoxia affects integration of sensory input by neurons in the nucleus tractus solitarii. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010 Nov 30;174(1–2):29–36.
303. Moraes DJA, Zoccal DB, Machado BH. Medullary respiratory network drives sympathetic overactivity and hypertension in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2012 Dec;60(6):1374–80.
304. Monge C, León-Velarde F. Physiological adaptation to high altitude: oxygen transport in mammals and birds. *Physiol Rev*. 1991 Oct;71(4):1135–72.
305. Schwenke DO, Bolter CP, Cragg PA. Are the carotid bodies of the guinea-pig functional? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007 Feb;146(2):180–8.

306. Mir AK, Al-Neamy K, Pallot DJ, Nahorski SR. Catecholamines in the carotid body of several mammalian species: effects of surgical and chemical sympathectomy. *Brain Res.* 1982 Dec 9;252(2):335–42.
307. Prabhakar NR, Peng Y-J, Yuan G, Nanduri J. Reactive oxygen radicals and gaseous transmitters in carotid body activation by intermittent hypoxia. *Cell Tissue Res.* 2018 May;372(2):427–31.
308. Pérez-García MT, Almaraz L, González C. Effects of different types of stimulation on cyclic AMP content in the rabbit carotid body: functional significance. *J Neurochem.* 1990 Oct;55(4):1287–93.
309. Rocher A, Caceres AI, Almaraz L, Gonzalez C. EPAC signalling pathways are involved in low PO₂ chemoreception in carotid body chemoreceptor cells. *J Physiol.* 2009 Aug 15;587(Pt 16):4015–27.
310. He L, Liu X, Chen J, Dinger B, Stensaas L, Fidone S. Modulation of chronic hypoxia-induced chemoreceptor hypersensitivity by NADPH oxidase subunits in rat carotid body. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2010 May;108(5):1304–10.
311. Conde SV, Monteiro EC, Obeso A, Gonzalez C. Adenosine in peripheral chemoreception: new insights into a historically overlooked molecule--invited article. *Adv Exp Med Biol.* 2009;648:145–59.
312. Prabhakar NR. Oxygen sensing by the carotid body chemoreceptors. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2000 Jun;88(6):2287–95.
313. Glitsch MD. Spontaneous neurotransmitter release and Ca²⁺--how spontaneous is spontaneous neurotransmitter release? *Cell Calcium.* 2008 Jan;43(1):9–15.
314. Prabhakar NR, Kumar GK, Peng Y-J. Sympatho-adrenal activation by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2012 Oct 15;113(8):1304–10.
315. Linz D, Mahfoud F, Schotten U, Ukena C, Neuberger H-R, Wirth K, et al. Renal sympathetic denervation suppresses postapneic blood pressure rises and atrial fibrillation in a model for sleep apnea. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2012 Jul;60(1):172–8.
316. Pawar A, Peng Y-J, Jacono FJ, Prabhakar NR. Comparative analysis of neonatal and adult rat carotid body responses to chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2008 May;104(5):1287–94.
317. Chen L, Zhang J, Gan TX, Chen-lzu Y, Hasday JD, Karmazyn M, et al. Left ventricular dysfunction and associated cellular injury in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2008 Jan;104(1):218–23.
318. Lesske J, Fletcher EC, Bao G, Unger T. Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia--influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system. *J Hypertens.* 1997 Dec;15(12 Pt 2):1593–603.
319. Laduron PM, Leysen JE. Domperidone, a specific *in vitro* dopamine antagonist, devoid of *in vivo* central dopaminergic activity. *Biochem Pharmacol.* 1979 Jul 15;28(14):2161–5.

320. Adegunsoye A, Ramachandran S. Etiopathogenetic mechanisms of pulmonary hypertension in sleep-related breathing disorders. *Pulm Med*. 2012;2012:273591.
321. Cardenas H, Zapata P. Ventilatory reflexes originated from carotid and extracarotid chemoreceptors in rats. *Am J Physiol*. 1983 Jan;244(1):R119-125.
322. Guyenet PG. Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. *Respir Physiol*. 2000 Jul;121(2-3):147-62.
323. Seidler FJ, Slotkin TA. Adrenomedullary function in the neonatal rat: responses to acute hypoxia. *J Physiol*. 1985 Jan;358:1-16.
324. Thompson RJ, Jackson A, Nurse CA. Developmental loss of hypoxic chemosensitivity in rat adrenomedullary chromaffin cells. *J Physiol*. 1997 Jan 15;498 (Pt 2):503-10.
325. Nurse CA, Salman S, Scott AL. Hypoxia-regulated catecholamine secretion in chromaffin cells. *Cell Tissue Res*. 2018 May;372(2):433-41.
326. Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Jun;305(3):800-11.
327. Rico AJ, Fernandez SP, Prieto-Lloret J, Gomez-Niño A, Gonzalez C, Rigual R. A comparative study of the hypoxic secretory response between neonatal adrenal medulla and adult carotid body from the rat. *Adv Exp Med Biol*. 2006;580:131-135-359.
328. Marshall JM. Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiol Rev*. 1994 Jul;74(3):543-94.
329. Neubauer JA, Sunderram J. Oxygen-sensing neurons in the central nervous system. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. 2004 Jan;96(1):367-74.
330. Marina N, Ang R, Machhada A, Kasymov V, Karagiannis A, Hosford PS, et al. Brainstem hypoxia contributes to the development of hypertension in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2015 Apr;65(4):775-83.
331. Khosla UM, Zharikov S, Finch JL, Nakagawa T, Roncal C, Mu W, et al. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int*. 2005 May;67(5):1739-42.
332. Pinheiro LC, Tanus-Santos JE, Castro MM. The potential of stimulating nitric oxide formation in the treatment of hypertension. *Expert Opin Ther Targets*. 2017 May;21(5):543-56.
333. Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation*. 1998 Nov 3;98(18):1842-7.
334. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Sep;20(9):2032-7.
335. Nash DT. Insulin resistance, ADMA levels, and cardiovascular disease. *JAMA*. 2002 Mar 20;287(11):1451-2.
336. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet Lond Engl*. 1992 Mar 7;339(8793):572-5.

337. Teerlink T, Luo Z, Palm F, Wilcox CS. Cellular ADMA: regulation and action. *Pharmacol Res.* 2009 Dec;60(6):448–60.
338. Surdacki A, Nowicki M, Sandmann J, Tsikas D, Boeger RH, Bode-Boeger SM, et al. Reduced urinary excretion of nitric oxide metabolites and increased plasma levels of asymmetric dimethylarginine in men with essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999 Apr;33(4):652–8.
339. Kielstein JT, Impraim B, Simmel S, Bode-Böger SM, Tsikas D, Frölich JC, et al. Cardiovascular effects of systemic nitric oxide synthase inhibition with asymmetrical dimethylarginine in humans. *Circulation.* 2004 Jan 20;109(2):172–7.
340. Jacobi J, Maas R, Cordasic N, Koch K, Schmieder RE, Böger RH, et al. Role of asymmetric dimethylarginine for angiotensin II-induced target organ damage in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Feb;294(2):H1058-1066.
341. Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem Pharmacol.* 2000 Jan 1;59(1):13–23.