



Universidad de Valladolid

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EFECTOS PRODUCIDOS POR LA HIPOXIA INTERMITENTE CRÓNICA EN RATAS JÓVENES (3MESES) Y VIEJAS (24 MESES).

Presentada por **MIGUEL QUINTERO COCA**
para optar al grado de
Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por: M^a TERESA AGAPITO SERRANO
RICARDO RIGUAL BONASTRE

FACULTAD: MEDICINA

DEPARTAMENTO: BIOQUIMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR Y FISIOLÓGIA

2015

Los resultados de este trabajo de tesis doctoral han sido publicados parcialmente en los siguientes artículos:

Agapito T., Vega-Agapito V., Gonzalez-Martin M. C., Quintero M., Baranda J. A. & Gonzalez C. "Comparison of redox status in rats exposed to chronic sustained and intermittent hypoxia. Journal of physiological sciences". 59, pp.267 - 267. (2009).

Quintero M., González-Martín M. C., Vega-Agapito V., González C., Obeso A., Farré R., Agapito T. & Yubero S. "The effects of intermitten thypoxia on redox status, NF-κB activation, and plasma lípido levels are dependent on the lowest oxygen saturation". Free Radical Biology and Medicine. (2013).

Quintero M., Olea E., Conde S., Obeso A., Gallego-Martín T., González C., Montserrat J., Yubero S., Gómez-Niño A., & Agapito T. "Age protects from harmful effects produced by chronic intermittent hypoxia. The Journal of Physiology". Enviado a publicar.

Y presentado en los siguientes congresos:

1^{as} Jornadas de formación CIBERES. Palma de Mallorca. Quintero M., González-Martín M. C., Vega-Agapito V., Baranda J. A., González C. & Agapito M. T. "Intermittent hypoxia and redox status in the rat". (2008)

XXXV Congreso de la SECF. Valencia. España. Quintero M., González-Martín M. C., Vega-Agapito V., Baranda J. A., González C. & Agapito M. T. "Modifications of the redox status produced by intermittent hypoxia in the rat". (2009)

XXXVI International Congress of Physiological Sciences. Kioto, Japón. Vega-Agapito V., González-Martín M. C., Quintero M., Baranda J. A., González C. & Agapito M. T. "Comparison of Redox Status in Rats Exposed to Chronic Sustained and Intermittent hypoxia". (2009)

XXXVI Congreso SECF. Santiago de Compostela. España. Quintero M., Olea E., Gonzalez-Martín M. C., Vega-Agapito V., González C., Agapito M. T. & Yubero S. "The effects of Intermittent hypoxia on redox status, NFB activation, and plasma lipid levels is dependent on the lowest oxygen saturation". (2012)

Agradecimientos

En primer lugar querría agradecer a la Dra. María Teresa Agapito directora de mi tesis, su sincero apoyo y ayuda, sin la cual hubiera sido imposible la elaboración del presente trabajo, que a pesar de las dificultades propias de la vida siempre supo orientar y dirigir el desarrollo de esta tesis doctoral.

Al Dr. Ricardo Rigual Bonastre codirector de esta tesis, su apoyo, paciencia y esfuerzo, sin los cuales hubiera resultado imposible la finalización del presente trabajo. Sinceramente muchas gracias a ambos.

A la Dra. Asunción Rocher, por su experiencia y desarrollo con los experimentos de biología molecular y su gran amabilidad.

Al Dr. Javier Castañeda por sus trabajos sobre presiones arteriales, su cordialidad y facilidad para buscar soluciones a los problemas imprevistos de los experimentos.

Querría mostrar mi sincero agradecimiento a todos los compañeros y compañeras del laboratorio las Dras Ana Obeso, Angela Gómez y Sara Yubero, las que próximamente pasaran por el proceso de escritura, Teresa Gallego.

Agradecer de forma especial a Elena Olea que sin su ayuda desinteresada en tantos momentos hubiera sido realmente difícil la consecución de este trabajo.

También quiero a agradecer sinceramente a Maria Llanos y Ana gordillo su comprensión y ayuda en muchos momentos.

A Daniel que me ha salvado tantas veces con la informática, muchas gracias.

También recordar y agradecer a todos los compañeros que han pasado durante todos estos años por el laboratorio por su aporte, ayuda y comprensión en tantos momentos, un especial recuerdo a Maria Ramírez que ayudó a suavizar los nervios previos de los congresos.

A Sandra que me ha apoyado y aguantado durante tantos años y que espero que siga haciéndolo.

No querría desaprovechar la oportunidad para recordar y agradecer al Dr. Constancio González Martínez por la oportunidad que me brindó para poder realizar la presente tesis doctoral, por su sabiduría y conocimiento ante cualquier duda, incluso a altas horas de la noche, por su energía, constancia y dedicación a pesar de las circunstancias personales, por todo ello muchas gracias.

A mi familia, mis padres Rosario y Miguel, a mi hermano Jesús por su apoyo y ayuda constante e incondicional, su ánimo en los momentos adversos, muchas gracias.

Abreviaturas

4-HNE	4-hidroxinonales
5-HT	Serotonina
ACS	Citrato sódico
ADMA	Dimetil arginina asimétrica
AHI	Índice de apnea hipopnea
AOS	Apnea obstructiva del sueño
AR	Arteria renal
ASaO ₂	Media de la saturación de hemoglobina
ASS	Ácido sulfosalicílico
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Seroalbumina bovina
CA	Catecolaminas
CAO ₂	Contenido alveolar de oxígeno
CaO ₂	Contenido arterial de oxígeno
CAT	Catalasa
CC	Cuerpo carotídeo
COX-2	Ciclooxigenasa de tipo 2
CPAP	Presión positiva continua en la vía aérea
CRP	Proteína C reactiva
CTE	Cadena transportadora de electrones
CvO ₂	Contenido venoso de oxígeno

DA	Dopamina
DE	Disfunción endotelial
DTNB	5-5`-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
E	Epinefrina
ECE	Enzima conversora de endotelina
ECSOD	Superóxidodismutasa extracelular o SOD-3
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEG	Electroencefalograma
E _{GSH}	Potencial redox de glutatión
EMG	Electromiograma
eNOS	Oxido nítrico sintasa endotelial
EOG	Electrooculograma
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ET-1	Endotelina tipo 1
ET _A	Receptor de endotelina A
FADH ₂	Flavín adenín dinucleótido reducido
GOT	Glutámato-oxalacetato transaminasa
GPT	Glutamato-piruvato transaminasa
Gpx	Glutatión peroxidasa
GR	Glutatión reductasa
GSH	Glutatión reducido
GSSG	Disulfuro de glutatión (glutatión oxidado)

GSt	Glutación total
Hb	Hemoglobina
HbO ₂	Oxihemoglobina
HCl	Hipoxia crónica intermitente
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico
HI	Hipoxia intermitente
HIF	Factor inducible por hipoxia
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
HRP	Peroxidasa de rábano
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1 β	Interleuquina 1 β
IL-6	Interleuquina 6
IL-8	Interleuquina 8
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LTF	Facilitación a largo a plazo
LPO	Lipoperóxidos
LSaO ₂	Mínimo de saturación de hemoglobina
MA	Medula adrenal
MDA	Malonaldehído
MeOH	Metanol
MetHb	Metahemoglobina
NAD ⁺	Nicotin adenin dinucleotido oxidado

NADH	Nicotin adenin dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotin adenin dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotin adenin dinucleótido fosfato reducida
NE	Norepinefrina
NF-κβ	Factor nuclear κB
NO [•]	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintasa
NOX 1	NADPH oxidasa de tipo 1
NOX	NADPH oxidasa
NOX-2	NADPH oxidasa de tipo 2
NSC	Nervio del seno carotídeo
NTS	Núcleo del tracto solitario
O ₂ ^{-•}	Anión superóxido
ODI	Índice de desaturaciones de oxígeno en una hora
PaCO ₂	Presión arterial de dióxido de carbono
PAO ₂	Presión alveolar de oxígeno
PaO ₂	Presión arterial de oxígeno
PCA	Ácido perclórico
PCO ₂	Presión parcial de dióxido de carbono
PCR	Proteína C reactiva
PO ₂	Presión parcial de oxígeno
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
PvO ₂	Presión venosa de oxígeno

REM	Movimiento rápido de ojos
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RVLM	Médula rostral ventrolateral
SAO ₂	Saturación alveolar de oxígeno
SaO ₂	Saturación arterial de hemoglobina
SAOS	Síndrome de apnea obstructiva del sueño
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SNC	Sistema nervioso central
SNS	Sistema nervioso simpático
SOD	Superóxido dismutasa
TBARS	Productos reactivos al ácido tiobarbitúrico
TBS-T	Buffer Tris salino
TEA	Trietanolamina
TNB	(5-tio-nitrobenzoico)
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
UI	Unidad internacional
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
WST-1	(2-(4-Yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio
XDH	Xantina deshidrogenasa
XO	Xantina oxidasa

Índice

Introducción.....	21
1 Hipoxia tisular.	23
1.1 Tipos de hipoxia Tisular	23
2 Quimiorreceptores arteriales	24
2.1 Estructura y función del cuerpo carotídeo	25
2.2 Transducción y transmisión en el cuerpo carotídeo.	27
3 La apnea obstructiva del sueño (AOS) y Síndrome Obstructivo del sueño (SAOS).....	29
3.1 Apnea obstructiva del sueño (AOS).....	30
3.2 Síndrome de la Apnea Obstructiva del Sueño (SAOS).....	31
4 El sueño. Aspectos fisiológicos.	31
4.1 Fase de sueño no REM.....	33
4.2 Fase de sueño REM.....	34
4.3 Variación de la Estructura del sueño con la edad.	35
4.4 Relación entre las distintas fases del sueño y la apnea obstructiva del sueño (AOS).	36
5 Causas del AOS.....	37
5.1 Pérdida del tono muscular.	37
5.2 Obesidad.....	38
5.3 Factores genéticos.....	39
6 Fisiopatología del AOS: Hipoxia Crónica Intermitente	40
6.1 Efectos de la HCl en el CC	40
6.1.1 Efectos generales reflejos originados en el CC	41
6.1.2 Mecanismos moleculares de la HCl en el CC y en el reflejo quimiorreceptor	43

6.2	Efectos de los mecanismos moleculares de la HCl independientes del CC y de la activación del simpático	47
7	Revisión de las bases moleculares del estado oxidativo.	50
7.1	Estres oxidativo. Conceptos generales.....	50
7.2	Especies reactivas del O ₂ , tipos y vías de producción	51
7.2.1	Anión superóxido O ₂ ^{•-}	51
7.2.2	Peróxido de hidrógeno H ₂ O ₂	55
7.2.3	Radical hidroxilo OH [•]	55
7.2.4	Peroxinitrito ONOO ⁻ (RNS)	55
7.3	Biomarcadores de daño oxidativo.....	56
7.3.1	LPO	56
7.3.2	Disminución de la actividad de la enzima aconitasa mitocondrial ...	58
7.4	Sistemas de eliminación de los ROS (antioxidantes).....	59
7.4.1	Sistemas no enzimáticos: Glutación.....	60
7.4.2	Sistemas antioxidantes enzimáticos.	62
8	Síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS).	64
8.1	Patologías cardiovasculares asociadas al SAOS: hipertensión sistémica.	66
8.2	Epidemiología de SAOS: relación con envejecimiento.....	68
8.3	Importancia socio-sanitaria de la apnea obstructiva del sueño	69
8.4	Tratamiento del AOS.	70
	Objetivos.....	73
	Material y métodos.....	77
1	Animales de experimentación.	79
2	Hipoxia intermitente (HI). Dispositivo y sistema utilizado	80
3	Procedimientos quirúrgicos.....	82
4	Recogida de sangre y parámetros hematológicos.....	82

5	Medida de los niveles de gases, saturación de hemoglobina y valores de pH en sangre.	82
6	Valoraciones del estado redox en tejidos.....	83
6.1	Valoración del Glutati3n reducido, Glutati3n oxidado y potencial redox E_{GSH}	83
6.2	Valoraci3n de per3xidos lip3dicos (LPO).	85
6.3	Valoraci3n de las actividades de los enzimas aconitasa y fumarasa.	86
6.4	Valoraci3n de la actividad de la enzima Glutati3n peroxidasa (GPx).....	87
6.5	Valoraci3n de la actividad de la catalasa.....	88
6.6	Valoraci3n de la actividad de la super3xido dismutasa (SOD).....	90
6.6.1	Determinaci3n de la expresi3n de las enzimas catalasa y SOD-1 y SOD-2 (Western Blot).....	91
6.7	An3lisis de la actividad del factor NF- κ B en h3gado.....	93
6.8	Valoraci3n de la prote3na C reactiva (PCR) en plasma.	93
7	Medida de la presi3n arterial sist3mica, y respuesta ante un est3mulo hip3xico.	93
8	Pletismograf3a.	94
9	Medidas de la actividad del sistema nervioso simp3tico.	95
9.1	Niveles de catecolaminas en plasma.....	95
9.2	Valoraci3n del contenido de catecolaminas en arteria renal.	96
9.3	S3ntesis en arteria renal.....	96
10	M3todos estad3sticos.	97
	Resultados.....	99
1	Comprobaci3n previa de la metodolog3a empleada	101
1.1	Datos gasom3tricos preliminares.....	101
2	Efecto de la HCl en ratas de 3 meses de edad con 2 niveles de intensidad (10 y 5% O ₂).....	103

2.1	Animales	103
2.2	Parámetros hematológicos y bioquímicos.	104
2.3	Evaluación del daño oxidativo	105
2.3.1	Marcadores de daño oxidativo	105
2.3.2	Actividades de enzimas eliminadores de daño oxidativo	110
2.3.3	Activación del factor NF- κ B en hígado.	112
2.3.4	Niveles de proteína C reactiva (PCR) en plasma.	113
2.4	Parámetros ventilatorios.	113
2.5	Actividad del SNS	115
2.5.1	Niveles de catecolaminas en plasma y síntesis y contenido en arteria renal.	115
2.5.2	Efectos de HCl sobre la presión arterial sistémica.	116
3	Efecto de la HCl en ratas de 24 meses de edad (24M).	118
3.1	Animales	118
3.2	Evaluación del daño oxidativo	119
3.2.1	Marcadores de daño oxidativo	119
3.2.2	Enzimas eliminadores de ROS	122
3.2.3	Proteína C reactiva.	125
3.3	Parámetros ventilatorios.	125
3.4	Actividad del SNS	126
3.4.1	Niveles de catecolaminas en plasma, contenido y velocidad de síntesis de ³ H-CA en arteria renal.	126
3.4.2	Síntesis y contenido de Norepinefrina en Arteria Renal.	127
	Discusión	129
1	Efectos generales de la HCl en animales jóvenes y viejos.	132
2	Estado redox en animales jóvenes 3M	134

2.1	Valoración de los biomarcadores	134
2.2	Enzimas eliminadores de ROS	136
2.3	Marcadores proinflamatorios.....	138
3	Efecto de la HCl en ratas viejas 24M.	138
4	Efecto de la edad sobre la respuesta ventilatoria tras la HCl.....	140
5	Efecto de la edad sobre la actividad del sistema simpático tras HCl	143
6	Consideraciones finales.	147
	Conclusiones	149
	Bibliografía	153

Introducción

En los animales más evolucionados el aporte de oxígeno desde la atmósfera hasta las células para realizar la respiración aerobia se lleva a cabo por los aparatos respiratorio y circulatorio. El aparato respiratorio bombea aire rico en oxígeno hasta los alveolos, donde se produce la difusión del oxígeno desde los alveolos a la sangre y la carga de la hemoglobina en los capilares pulmonares. El aparato circulatorio distribuye la sangre rica en oxígeno hasta los capilares periféricos en los que se produce la disociación del oxígeno de la hemoglobina y su difusión al medio extracelular e intracelular.

En las mitocondrias se produce la oxidación de los nutrientes mediante la cadena transportadora de electrones (CTE), constituyendo este último proceso la respiración aeróbica. A través de la respiración aeróbica las células obtienen energía debido a la reducción del oxígeno por los equivalentes de reducción de los nutrientes, canalizados en los coenzimas de oxidación-reducción tanto $\text{NADH}+\text{H}^+$ como FADH_2 , produciéndose como productos de desecho el dióxido de carbono y agua. El dióxido de carbono como producto de desecho sigue un camino inverso desde la mitocondria a la atmósfera.

1 Hipoxia tisular.

La hipoxia es la situación en la que el organismo o una parte del mismo no recibe el suministro adecuado de O_2 . Las causas de la hipoxia son variadas. Un ejemplo de hipoxia generalizada ocurre en individuos sanos al ascender a grandes alturas. La hipoxia tisular localizada se produce en alteraciones circulatorias por disminución del riego sanguíneo en dichos tejidos que también se llama isquemia tisular.

1.1 Tipos de hipoxia Tisular

Podemos distinguir diferentes tipos de hipoxia atendiendo a la causa de su aparición:

- Hipoxia hipóxica. Ocurre por un aporte inadecuado de oxígeno a la sangre que se origina por la disminución de la presión arterial de O_2 (PaO_2), y por consiguiente de la saturación de la hemoglobina que conduce a una disminución de la disponibilidad de O_2 en las células y mitocondrias. Las causas que originan la disminución de la PaO_2 son la disminución de la presión alveolar de O_2 (PAO_2) o la disminución de la difusión alveolo/capilar o alteraciones del cociente respiratorio. La sangre venosa también tiene disminuida su PvO_2 y la saturación de hemoglobina.
- Hipoxia anémica. Sucede al disminuir la hemoglobina funcional lo que conduce a una menor capacidad de transporte de O_2 , así como a la disminución de la

hemoglobina para ligar o desprender el O₂, disminuyendo con ello la disponibilidad de O₂ por las células y sus mitocondrias.

- Hipoxia de estásis Se produce por un enlentecimiento de la velocidad de circulación de la sangre, pudiendo ser local o sistémica (shock).
- Hipoxia histotóxica ocurre cuando existe una incapacidad de las células para utilizar el oxígeno, como consecuencia de la inhibición de los procesos celulares que lo utilizan para producir energía. En sangre arterial la PaO₂ y el contenido de O₂ (CaO₂) transportado son normales pero en sangre venosa son elevados pues su consumo está disminuido.

Dentro de la hipoxia hipóxica, se pueden distinguir varios tipos según las circunstancias y su forma de instauración y su duración:

- Hipoxia aguda: aparece de forma rápida y su duración es escasa (minutos).
- Hipoxia fisiológica o de grandes alturas: es una hipoxia hipóxica sostenida (días, meses, años, toda la vida) debida a la disminución de la presión atmosférica de O₂. Esta hipoxia es fisiológica porque puede cursar sin originar patologías aparentes durante toda la vida del individuo aunque puede conducir a complicaciones fatales por falta de adaptación (González et al., 1998).
- Hipoxia crónica sostenida patológica: se trata de un tipo de hipoxia sostenida que aparece como consecuencia de una patología crónica, frecuentemente pulmonar y a menudo está asociada a hipercapnia. Este tipo de hipoxia es característica del EPOC.
- Hipoxia crónica intermitente (HCl): En este caso, el organismo sufre episodios de hipoxia intercalados con episodios de normoxia (Neubauer 2001). Es frecuente que suceda durante el periodo de sueño (8 horas) en el que se suceden episodios de hipoxia de corta duración debido a obstrucciones periódicas de las vías aéreas de forma intermitente, mientras que la vigilia (16 horas) se caracteriza por un estado de normoxia. Este tipo de hipoxia se denomina Apnea obstructiva del sueño (AOS) cuando frecuencia e intensidad de los periodos de hipoxia alcanzan cierta gravedad. Durante los episodios de apnea obstructiva las PAO₂, PaO₂ y PVO₂ y los CaO₂ y CvO₂ están disminuidos mientras que PaCO₂ están aumentados.

2 Quimiorreceptores arteriales

El organismo necesita mantener unos niveles de O₂ arteriales (PaO₂ y CAO₂) que aseguren un aporte adecuado a las necesidades metabólicas de los tejidos periféricos. Para cumplir esta función homeostática el organismo dispone de mecanismos especializados situados estratégicamente que midan los niveles de O₂ y activan mecanismos capaces de minimizar estas modificaciones o normalizarlos en situaciones

en que estén alterados. Los animales superiores poseen mecanismos de regulación que tienden a prevenir o minimizar cualquier tipo de hipoxia y que usan como efectores a los aparatos respiratorio y circulatorio. Los quimiorreceptores del cuerpo carotídeo (CC) detectan disminución de PaO_2 e inician, reflejos encaminados a aumentar el bombeo de aire rico en O_2 desde la atmósfera a los alvéolos. En este contexto, se dice que los CC (con alguna posible contribución de los cuerpos aórticos) tienen una función adaptativa, ya que la hiperventilación que desencadenan su activación al disminuir la PaO_2 hace posible que los animales sanos, realicen las funciones vitales de forma adecuada y se adapten a altitudes con presiones barométricas de hasta unos 350 mm Hg. La gran sensibilidad (umbral bajo y ganancia alta, en términos fisiológicos) de los CC a la hipoxia se acompaña de una gran resistencia a sus efectos deletéreos, lo que llevó a denominarlo '*ultimum moriens*' (Schmidt 1938)

2.1 Estructura y función del cuerpo carotídeo

El cuerpo carotídeo (CC) es un pequeño órgano par situado en las proximidades de las bifurcaciones carótidas, su localización y tamaño varía entre especies, en el humano adulto tiene un tamaño de unos 2 mm de diámetro. Recibe inervación simpática por medio del nervio del seno carotídeo (NSC), que a su vez conecta con el nervio glossofaríngeo.

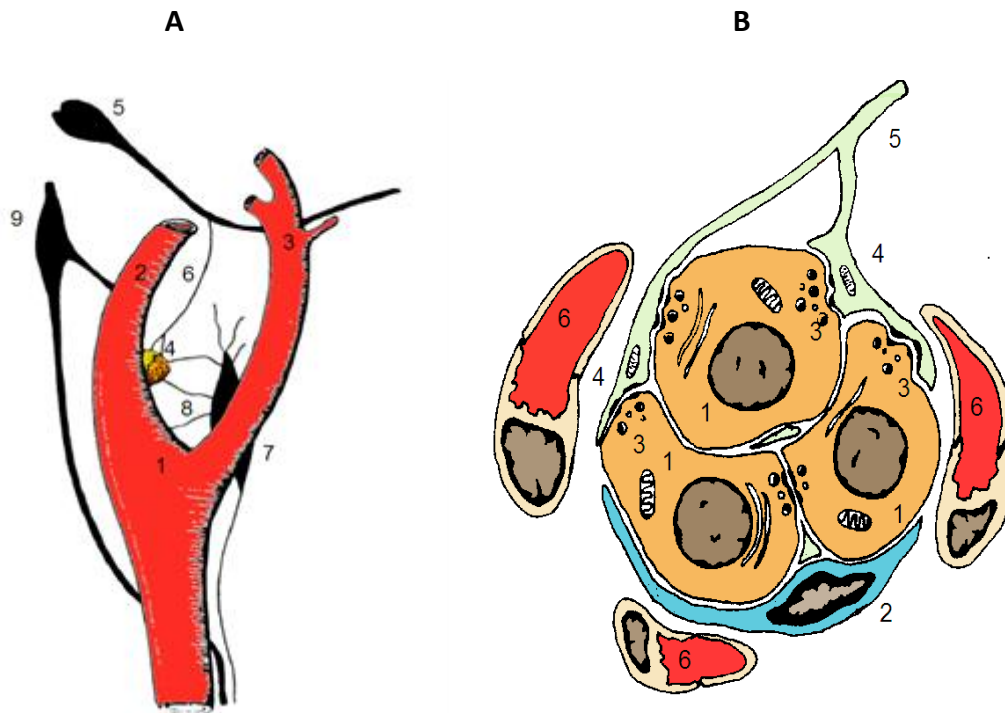


Figura 1. A Representación esquemática de la localización anatómica de un cuerpo carotídeo: 1, carótida común; 2, carótida interna; 3, carótida externa; 4, cuerpo carotídeo; 5, ganglio petroso; 6, nervio del seno carotídeo; 7, ganglio cervical superior; 8, nervios gangliomerulares; 9, ganglio nodoso. B. Organización estructural de un glomérulo glómico: 1, células glómicas, quimiorreceptoras o de tipo I; 2, célula sustentacular o de tipo II; 3, vesículas sinápticas; 4, terminaciones nerviosas sensoriales; 5, fibra sensorial; 6, capilares que rodean el islote celular.

El CC está organizado en forma de islotes que constituyen el parénquima glómico, separados por tejido conectivo y recibe amplia vascularización desde la arteria glómica que emerge de la carótida externa, hay capilares tortuosos en torno a los cuales se organizan los islotes celulares, pero también abundan los capilares rectos y algunas anastomosis arteriovenosas. El glomérulo es su unidad funcional y está formado un islote celular y la red de capilares que lo irrigan. En cada islote se reconocen dos tipos de células: glómicas quimiorreceptoras o de tipo I y sustentaculares, capsulares o de tipo II. Las primeras son redondas u ovoides, poseen un citoplasma rico en vesículas de núcleo denso y tienden a ocupar el centro de los islotes; las segundas son aplanadas, no poseen especializaciones citoplasmáticas y se sitúan en la periferia de los islotes celulares. Las células tipo II son consideradas células de soporte de naturaleza neuroglial, siendo las células de tipo I los quimiorreceptores primarios.

Las células de tipo I, más numerosas que las de tipo II, reciben inervación del NSC. Las fibras sensoriales provienen de neuronas que se asientan en el ganglio glossofaríngeo

inferior, petroso o ganglio de Andersch produciéndose sinapsis con ellas. Posteriormente estas fibras sensoriales vehiculadas por el nervio glossofaríngeo conectan con el tronco del encéfalo llevando inervación aferente hasta el núcleo del tracto solitario (NST) (Kline 2010), donde se integra la señal aferente de una manera plástica (Kline 2010; González-Martin et al., 2011; González et al., 2014).

El CC también recibe inervación parasimpática de neuronas agrupadas en microganglios en la superficie del CC, así como de neuronas a lo largo del NSC y de la unión del NSC con el glossofaríngeo (de Castro, 1926). Estas neuronas son de carácter nitrérgico-colinérgico (Wang et al., 1995; Campanucci et al., 2003) inervando los capilares intraglómicos controlando el flujo sanguíneo, siendo responsables de la hiperemia funcional que refleja el CC en situaciones de hipoxia, al actuar de forma vasodilatadora y de forma opuesta a como lo hacen las fibras de origen simpático que inervan la red vascular del CC.

2.2 Transducción y transmisión en el cuerpo carotídeo.

Una vez que la señal ha sido detectada por el sensor, se produce el mecanismo de transducción que conduce a la transformación de esta señal, en otra forma de energía ya sea en una o varias etapas. En el caso del CC que es un receptor sensorial secundario se pueden diferenciar dos etapas:

- **Transducción:** la energía del estímulo es transformada en respuesta secretora con liberación de neurotransmisores.
- **Transmisión:** la señal química procedente de la liberación de los neurotransmisores se transforma en señal eléctrica en la fibras sensoriales.

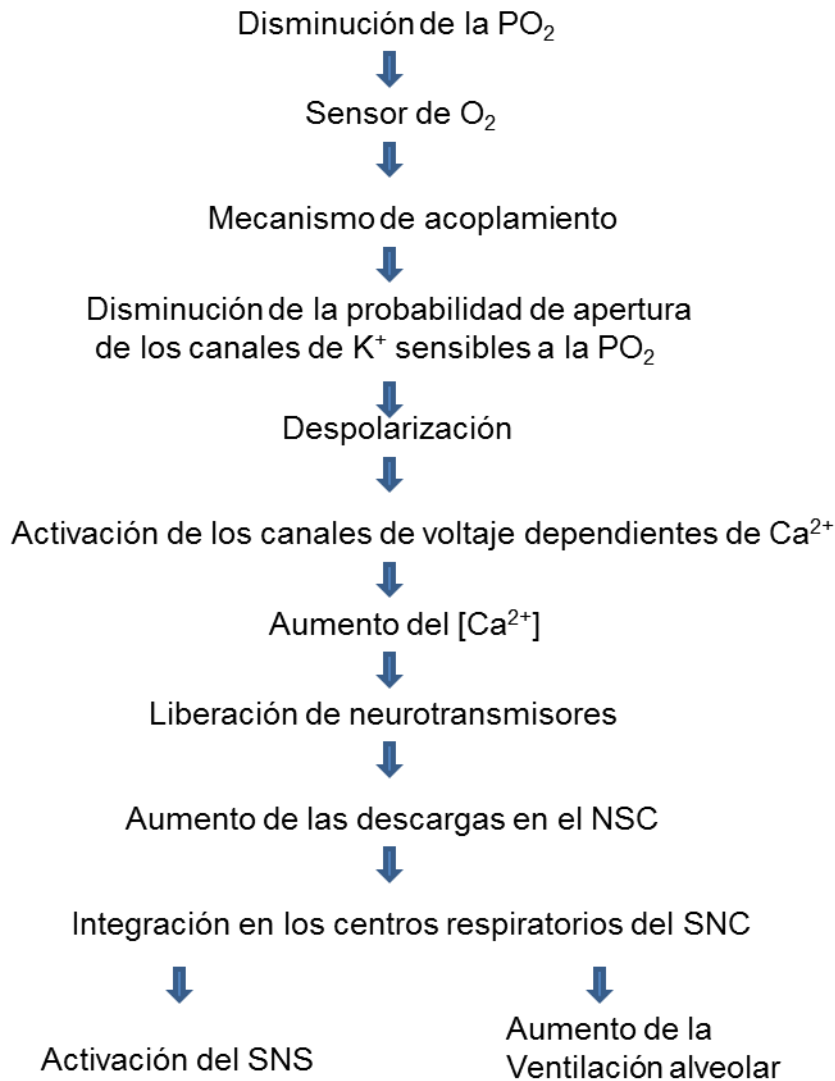


Figura 2. Cascada de transducción hipóxica en las células quimiorreceptoras del cuerpo carotídeo y efectos sobre activación del simpático y ventilación alveolar. NSC (nervio del seno carotídeo), SNC (sistema nervioso central), SNS (sistema nervioso simpático).

Este modelo de transducción del estímulo hipóxico se conoce como el modelo de membrana (González et al., 1992) aunque todavía hay algunos aspectos aún no resueltos. En el caso de la hipoxia el mecanismo sensor se localiza en las células tipo I. El proceso de acoplamiento sensor-estímulo hipóxico lleva a un cambio conformacional de la estructura del sensor, que lleva a una disminución en la probabilidad de apertura de los canales de K⁺ sensibles a la PO₂, que provoca una despolarización celular, con la consiguiente activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje, la entrada de Ca²⁺ extracelular provoca la liberación de neurotransmisores al espacio sináptico (González et al., 1992; 1994) que conduce a la activación de las terminaciones sensoriales del NSC. Experimentalmente se puede comprobar, que los impulsos nerviosos que se generan en

el CC y que se registran en el nervio del seno carotídeo (NSC), persisten por lo menos media hora después de muerto el animal. Por otra parte, las descargas originadas en los CC mantienen la respiración en animales profundamente anestesiados pues dejan de respirar al suministrarles 100% O₂ en vez de aire al silenciarse los quimiorreceptores. Además, los CC detectan los incrementos PaCO₂ o la [H⁺] junto con los quimiorreceptores centrales y alguna contribución de los cuerpos aórticos e inician una hiperventilación refleja que tiende a descargar el exceso de CO₂ a la atmósfera; esto es, los CC tienen una importante función homeostática de los niveles de CO₂ y del pH. Los CC también detectan cambios en la temperatura y osmolaridad pero el significado funcional de estas detecciones no está bien definido a nivel sistémico (ver González et al., 1992; 1995). Estudios más recientes proponen un papel de las células glómicas en los niveles de glucemia aunque existe controversia al respecto y también se ha propuesto una relación entre insulina y quimiorreceptores (Ribeiro et al., 2013; Limberg et al., 2014; ver Prabhakar and Jeiner 2015).

El estímulo quimiorreceptor se transmite por el NSC hasta los centros nerviosos en el tronco encéfalo (núcleos del tracto solitario y de la médula rostral ventrolateral), donde se integra la señal quimiorreceptora en los centros responsables de la ventilación, produciéndose además un aumento del tono simpático. Este aumento del tono simpático, conlleva la liberación de catecolaminas (CA) en las terminaciones simpáticas y medula adrenal (MA), produciendo el aumento de la presión arterial sistémica.

3 La apnea obstructiva del sueño (AOS) y Síndrome Obstrutivo del sueño (SAOS)

Recientemente se ha propuesto un papel importante del CC en la fisiopatología del AOS y del consecuente SAOS. En esta sección haremos una breve introducción a estos trastornos en los que se enmarcan los objetivos de este trabajo.

Previamente a tratar la apnea obstructiva del sueño es conveniente introducir algunos conceptos sobre apnea y sueño.

La apnea se define como una reducción total del flujo de aire de al menos 10 segundos (incluso a 30 o 40 segundos), mientras que se considera hipoapnea cuando existe una reducción parcial del flujo de aire.

Las apneas se clasifican según la causa que las origina en:

Apnea central: la ausencia de movimientos ventilatorios es producto de la eliminación de la actividad del centro respiratorio, en ausencia de resistencia ventilatoria.

Apnea mixta: comienza como una apnea central, seguida de un componente obstructivo.

Apnea obstructiva: se produce por oclusión de la vía aérea superior debida a colapso parcial o total, y sucede con hipoventilación alveolar a pesar del que persisten los esfuerzos ventilatorios

3.1 Apnea obstructiva del sueño (AOS).

Este trastorno se caracteriza por repetidas oclusiones totales o parciales de las vías aéreas superiores impidiendo el flujo de O₂ al aparato respiratorio y circulatorio durante el periodo de sueño que desaparece en estado de vigilia.

Las causas del AOS son complejas no son bien conocidas (ver apartado 6 de esta Sección) pero se puede generalizar que se debe al predominio neto de los factores que favorecen el cierre sobre los que favorecen la apertura de la vías aéreas superiores y se ha propuesto un papel fundamental a la inhibición de la actividad de los músculos dilatadores de las vías aéreas (Somoza et al., 2015).

Con cada obstrucción se produce una disminución de PaO₂ y de la SaO₂ y aumento de la PaCO₂ y [H⁺], lo que activa los quimiorreceptores periféricos (fundamentalmente el CC) que envían una señal a los centros reguladores del sueño, de la respiración y activa el Sistema Nervioso Símpatático (SNS), provocando un microdespertar, que activa la contracción de los músculos dilatadores de las vías aéreas superiores y se restaura la respiración y los valores normales de gases en sangre (Dempsey et al., 2010; Dempsey et al., 2014).

Por tanto en el AOS se produce una hipoxia en cada obstrucción que se repite durante el sueño y se transforma en crónica al extenderse en el tiempo. Su diagnóstico se realiza por el relato de la pareja de ronquido intenso, apneas y somnolencia diurna excesiva debido a los microdespertares que impiden el descanso. La confirmación se realiza a

través de un estudio de polisomnográfico durante el sueño (Somoza et al., 2015; Levy et al., 2015).

El criterio más utilizado para la clasificación de la severidad del AOS es el índice de episodios de apnea/hipopnea por hora (AHI). Según el índice de AHI los pacientes que presentan eventos entre 5 y 15 por hora se considera que padecen un AOS leve, entre 15 y 30 obstrucciones a la hora se considera un AOS moderado y más de 30 episodios en una hora un AOS severo; este grupo sufriría más de 240 episodios hipóxicos/noche. La hipoxia modifica otros parámetros que se han utilizado para la clasificación de la apnea: PaO₂, SaO₂, la media de la saturación de O₂ (ASaO₂), el valor mínimo de la saturación de O₂ (LSaO₂) y por último el porcentaje de tiempo total, con un nivel de saturación de O₂ total por debajo del 90% (T<90%). Sin embargo Chaudhary que clasifica a sus pacientes en tres grupos que se corresponden a AHI <20, entre >20 - 50< y >50, encuentra una buena correlación entre ASaO₂ y LSaO₂ y el AHI pero una pobre o ninguna relación entre el AHI y T<90% (Chaudhary et al., 1998).

3.2 Síndrome de la Apnea Obstructiva del Sueño (SAOS)

Con los años, la AOS genera un síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS), que es la AOS más una serie de patologías asociadas (Somoza et al., 2015; Levy et al., 2015): cardiovasculares (riesgo de padecer hipertensión y accidentes cardiovasculares agudos; (Lurie, 2011), hepato-metabólicas (obesidad, resistencia a la insulina, y esteatosis hepática no alcohólica; Vgontzas et al., 2005; Conde et al., 2014) y neuropsiquiátricas (ansiedad, depresión y déficits cognitivos-demencias, además de alteraciones causadas por los accidentes cerebrovasculares agudos; (Saunamaki & Jehkonen, 2007; Gozal, 2013).

4 El sueño. Aspectos fisiológicos.

Dado que la AOS ocurre durante el periodo de sueño, trataré brevemente las fases del sueño fisiológico y su relación con la apnea del sueño. El sueño puede ser definido como un estado fisiológico, caracterizado por una reducción de la actividad motora, con un aumento de la actividad vagal, y del umbral sensorial hacia el cual el individuo responde, la adopción y cambios de posturas características, una fácil reversibilidad del estado y por la presencia de una serie específica de señales electrográficas

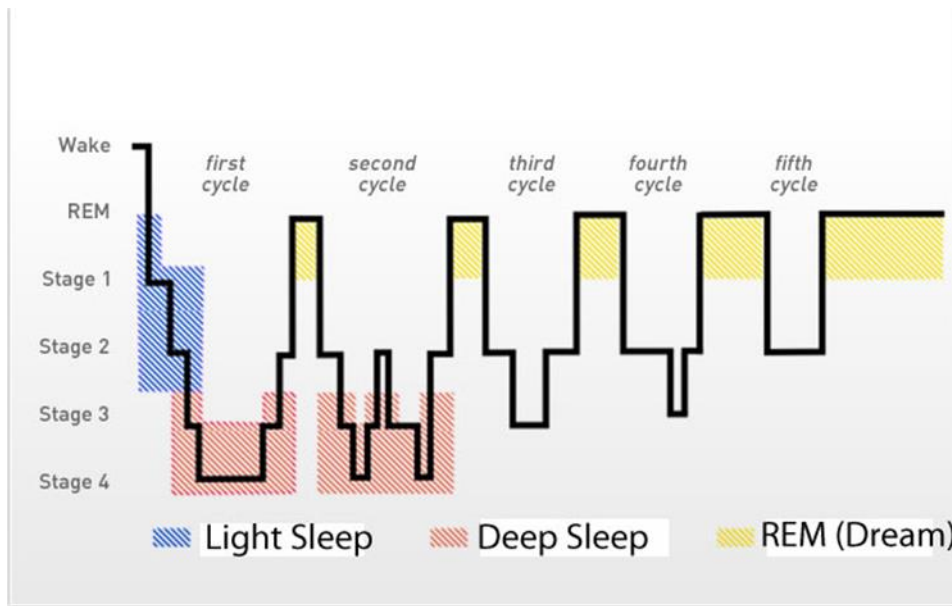


Figura 3. Estructura de las diferentes fases (1-4) de etapa no-REM y fase REM en los ciclos del sueño.

El sueño tiene una estructura cíclica y ordenada (fase no REM y fase REM), cada ciclo tiene una duración aproximada de 90 minutos, siendo la proporción de no REM mayoritaria a primeras horas de la noche, mientras que la fase REM predomina en las últimas horas. La repetición de varios de estos ciclos conforma un episodio completo de sueño.

Para diagnosticar alteraciones del sueño se utiliza la polisomnografía (ver Levy et al., 2015) que reúne medidas electroencefalográficas (EEG) de las neuronas corticales, electrooculográficas (EOG) del movimiento de los ojos y electromiográficas (EMG) de la actividad muscular, además de medidas de frecuencia cardiaca, nivel de saturación de O₂ en sangre, cambios de postura etc.

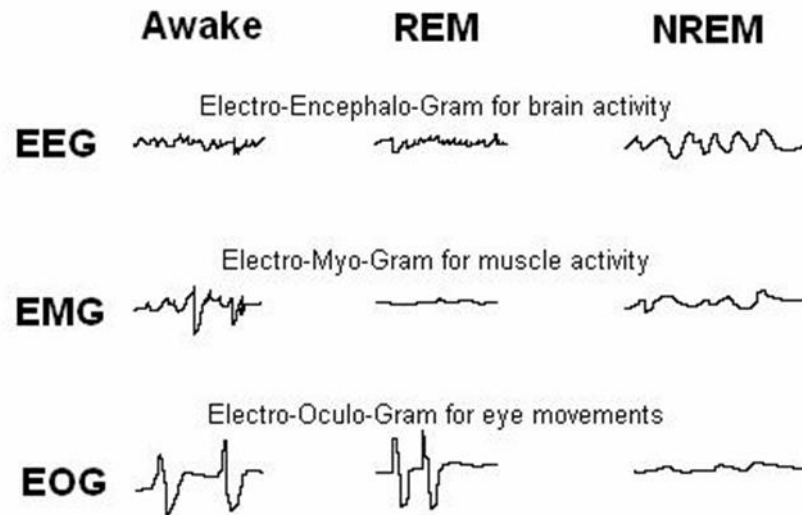


Figura 4. Representación de las ondas polisomnográficas en estado de vigilia, sueño REM y sueño no-REM. (EEG) electroencefalograma, (EMG) electromiograma, (EOG) electrooculograma.

El proceso del sueño comienza al pasar de un estado de vigilia a la fase de sueño no REM, y posteriormente a la fase de sueño REM, caracterizada principalmente por una inhibición de la musculatura somática y por el característico movimiento rápido de los ojos.

4.1 Fase de sueño no REM

La fase de sueño no REM se caracteriza por una baja actividad neuronal y una disminución en la actividad metabólica, disminución del ritmo cardíaco, presión arterial y temperatura cerebral, en esta fase del sueño hay una disminución de la actividad del sistema nervioso simpático, con el consiguiente aumento de actividad parasimpática.

Está formada por 4 fases cada una de las cuales tiene unos cambios tanto de EEG como de EOG y EMG característicos.

En el paso de la vigilia a la fase 1 (adormecimiento) de sueño no REM se produce una disminución de la frecuencia en el EEG de ondas beta (14-25 Hz) y gamma (30-80 Hz) con parpados abiertos y alfa (8-13 Hz) con parpados cerrados, a ondas theta (4-7 Hz). En esta fase 1 de sueño no REM se produce una disminución del tono muscular y una pérdida de la consciencia exterior, los movimientos oculares o bien no están presentes o son aislados.

En la fase 2 (sueño ligero) prosigue la disminución de la frecuencia siguiendo en el orden de las ondas theta, en esta fase hay 2 tipo de ondas características: ondas

denominadas huso de sueño o "spindles" (12-16 Hz) de frecuencia que aparecen de forma intermitente y breve, y las ondas llamadas complejo K que presentan una primera fase negativa de gran amplitud seguida de una fase positiva de menor amplitud y más lenta.

En la fase 3 aumenta la cantidad de ondas lentas de tipo delta (0.5-4 Hz), en esta fase el sueño es más profundo y la posibilidad de despertar ha disminuido, aquí el tono muscular disminuye aunque sigue presente.

La fase 4 es la fase de sueño profundo, en ella continua la disminución de la actividad del EEG con mayoría de ondas delta y el tono muscular está muy disminuido.

En su conjunto las fases 3 y 4 de sueño no REM son conocidas como fase de sueño de ondas lentas.

4.2 Fase de sueño REM

También se conoce como fase de sueño paradójico, debido a que mientras la frecuencia y amplitud de las ondas presentes en el EEG son similares a las presentadas en el estado de vigilia, (frecuencias rápidas y bajo voltaje) mezclado con ondas theta, existe una fuerte y marcada inhibición del tono muscular (atonía), a excepción de los músculos del diafragma y oculares. En esta fase aparecen breves contracciones faciales y en las extremidades, a pesar de la atonía generalizada, y es característico el movimiento rápido de ojos que da nombre a esta fase del sueño.

La fase de sueño REM aunque es continua tiene 2 características principales: una es la fase tónica caracterizada por la atonía generalizada y las características ondas de bajo voltaje y alta frecuencia (ocurre durante toda la fase de sueño REM), y la fásica en la que se presentan las contracciones musculares breves y el movimiento ocular característico (aparecen de forma breve e intermitente).

En la fase REM se produce un aumento del metabolismo y de la temperatura del cerebro, y se produce una disminución de la respuesta corporal a cambios de temperatura llevando con ello la temperatura corporal hacia la temperatura ambiente. Un ciclo de sueño completo estaría de esta manera organizado pasando desde una fase inicial de adormecimiento y sueño ligero (fases 1 y 2 no REM), a una fase de sueño profundo (fases 3 y 4 no REM), para posteriormente pasar a la fase de sueño activa o

paradójica (fase REM). Un ciclo tiene una duración de unos 90-110 minutos en humanos adultos, y normalmente la repetición de 4 a 5 ciclos no REM-REM constituyen una etapa completa de sueño.

4.3 Variación de la Estructura del sueño con la edad.

La duración y estructura del ciclo de sueño varia con la edad, así en recién nacidos la duración del periodo de sueño es aproximadamente de 16 horas diarias, siendo casi el 50% del tiempo total de tipo REM, en los cuales se hace menos evidente tanto la atonía característica de esta fase de sueño presente en los adultos, como las características contracciones musculares. La duración del ciclo no REM-REM en recién nacidos es de unos 45 minutos, disminuyendo con el avance de la edad tanto en duración del sueño diaria como el porcentaje de sueño REM dentro del total. En individuos adultos el periodo total de sueño se reduce a unas 8 horas diarias de las cuales el 25% del total es de tipo REM.

Al comparar el sueño de individuos ancianos con el de los adultos jóvenes, se observan cambios que afectan tanto a la arquitectura del sueño nocturno como al ritmo circadiano de sueño-vigilia. Todos estos cambios contribuyen a que el sueño de los ancianos se caracterice por ser más “frágil” que el de jóvenes.

En términos generales los ancianos presentan: 1.un aumento del tiempo de latencia antes de iniciar el sueño, 2. disminución de la cantidad de sueño profundo (fase 3 y 4 no REM) y del REM, 3 aumento del sueño ligero (fase 1 y 2 no REM), 4. sueño fragmentado y dificultad para reiniciar el sueño, 5. somnolencia, 6. aumento del número de cambios de postura, 7. disminución del umbral para despertarse con estímulos auditivos. 8. disminución del tiempo de sueño nocturno, pero el total de horas dormidas puede ser el mismo. 9. reducción de la amplitud y desincronización de ritmos circadianos.

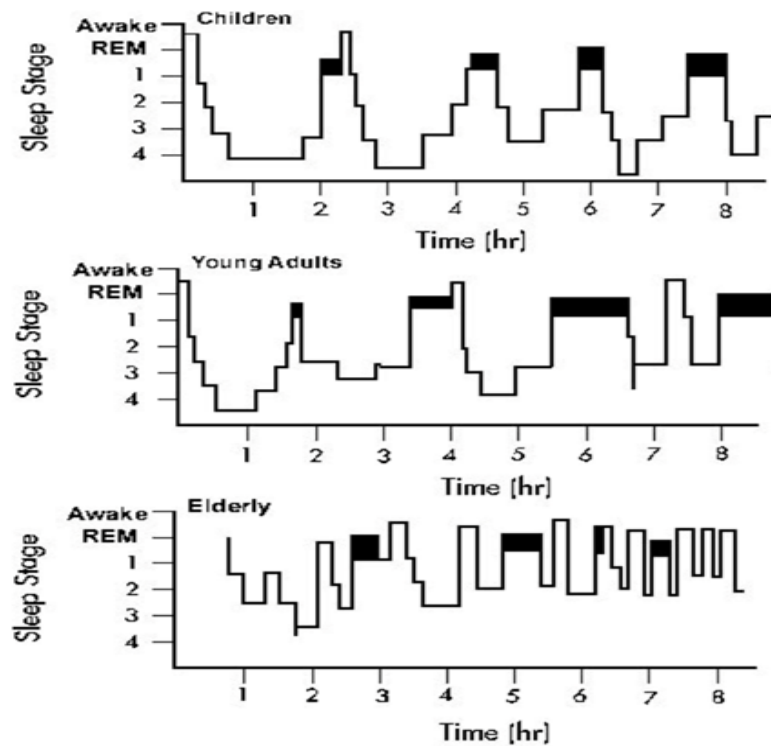


Figura 5. Estructura y duración de las distintas fases del sueño en la niñez, juventud y edad avanzada.

Existe controversia sobre si la necesidad de sueño disminuye con la edad. Sin embargo, las personas de edad avanzada sanas tienden a necesitar y a obtener el mismo tiempo de sueño que tenían cuando eran jóvenes, aunque pueden tener distinta arquitectura y diferente distribución del mismo en el día. Se puede decir que los ancianos pasan más tiempo en la cama, menos de él durmiendo, ya que tardan más tiempo en conciliar el sueño, presentan más despertares, con periodos de vigilia nocturna prolongados y tienen menor eficiencia de sueño.

4.4 Relación entre las distintas fases del sueño y la apnea obstructiva del sueño (AOS).

Fisiológicamente, en las fases 3 y 4 del sueño no-REM y principalmente durante la etapa del sueño REM, disminuye la actividad nerviosa hacia los músculos inspiradores y los dilatadores de las vías aéreas (Dempsey et al., 2010), con el resultado de una disminución de la ventilación y un aumento en la resistencia de las vías aéreas.

Cada episodio de obstrucción comienza con una disminución de la SAO_2 y ralentización de ritmo cardíaco pero al final del episodio apnéico el ritmo cardíaco se acelera y aparecen las ondas alfa características de un estado de vigilia con parpados cerrados en el EEG, y el EMG presenta alta actividad con el fin de recuperar el tono

muscular que abra las vías aéreas y con ello restablecer los valores normales de gases en sangre (Levy et al., 2015).

Los microdespertares hacen que la arquitectura normal del sueño quede alterada existiendo un predominio de la fase 1 de sueño no REM sobre las fases 3 y 4, lo que lleva a un sueño de baja calidad, que sería el responsable de la fatiga y excesiva somnolencia reflejada por los pacientes con AOS (Levy et al., 2015; Kandel 2000).

5 Causas del AOS.

Ya se ha comentado que las causas del AOS son complejas (Somoza et al., 2015) pero trataremos de analizarlas en este apartado.

5.1 Pérdida del tono muscular.

Se ha propuesto que factores mecánicos que reducen la amplitud de las vías aéreas superiores, y algún tipo de impedimento en la contracción de los músculos dilatadores de las vías aéreas por parte del sistema nervioso central, o bien una pobre respuesta de los músculos dilatadores llevan a la pérdida periódica de la capacidad de apertura durante el sueño, A lo anterior se añade una disminución de la actividad del músculo geniogloso, que causa la caída de la lengua hacia atrás cerrando las vías aéreas (Morrison et al., 1993; Ryan & Bradley 2005; Tsai et al., 2013; Levy et al., 2015; Somoza et al., 2015).

Esta pérdida de tono muscular de los músculos dilatadores encargados de la apertura de las vías aéreas superiores se acentúa durante las fases 3 y 4 de sueño no REM, en la que se produce hipotonía y principalmente durante la fase de sueño REM, en la cual se produce atonía, sería una de las causas fundamentales (Levy et al., 2015).

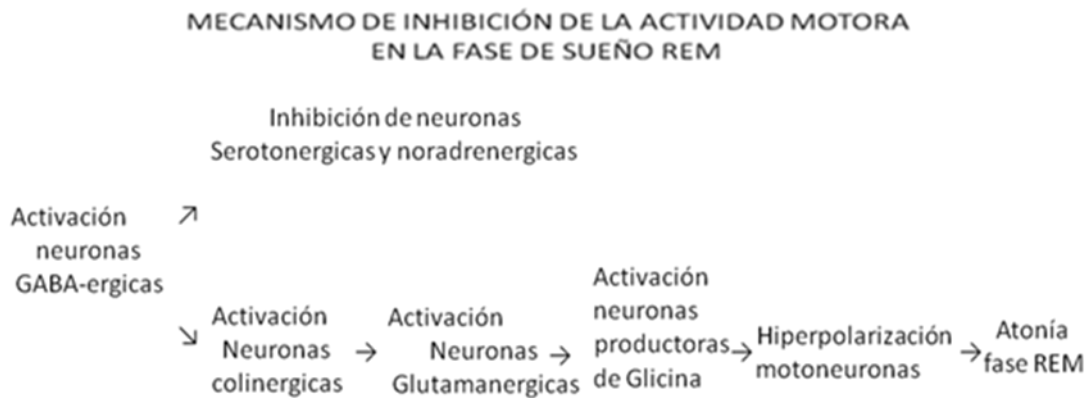


Figura 6. Representación esquemática de la inhibición motora que produce la atonía en la fase de sueño REM, (Kandel 2000).

En la fase de sueño REM se produce una activación de una serie de neuronas GABA-érgicas situadas en la protuberancia o puente del troncoencéfalo, esta activación produce una inhibición de neuronas productoras de serotonina y noradrenalina, al tiempo que produce la activación o desinhibición de neuronas productoras de acetilcolina, estas neuronas colinérgicas situadas igualmente en la protuberancia troncoencefálica excitan neuronas glutamatérgicas. Las neuronas glutamatérgicas proyectan conexiones hacia la médula conectando con interneuronas que liberan glicina en neuronas motoras, que hiperpolariza a estas neuronas motoras. Esta hiperpolarización de las neuronas motoras unida a la reducción en la liberación de serotonina (5-HT) y noradrenalina produciría finalmente la parálisis motora característica de la fase de sueño REM (ver el esquema de la fig 6; Kandel 2000).

5.2 Obesidad.

La obesidad es una factor de riesgo fundamental del AOS, de hecho el paciente prototipo con AOS es un hombre obeso de mediana edad.

En individuos obesos existe un incremento de depósitos de grasa en la faringe y resto de estructuras de las vías aéreas superiores, este acúmulo de depósitos de grasa dificulta la apertura de las vías aéreas, favoreciendo con ello su colapso.

Existe una relación directa entre el peso y la intensidad del AOS, de manera que a mayor aumento de peso, mayor depósito de grasa en las vías aéreas y disminución de la apertura de dichas vías.

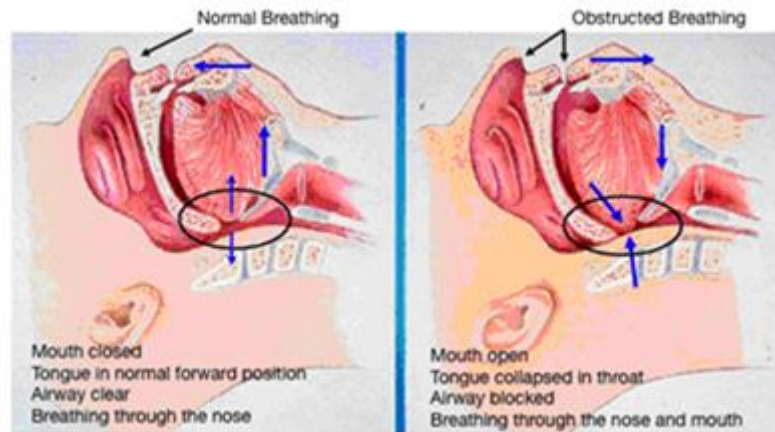


Figura 7. Imagen de individuo con AOS en el que se observa el desplazamiento de la lengua hacia la parte posterior obstruyendo las vías aéreas superiores.

5.3 Factores genéticos.

En los individuos con AOS, se observan algunas diferencias anatómicas características de causa genética como la presencia de retrognatismo (disminución del tamaño de la mandíbula), el posicionamiento inferior del hueso hioides, o una posición más retrasada de la mandíbula (Leung et al., 2012). También facilita padecer AOS un tamaño excesivo de la lengua, cuello corto, hipertrofia de amígdalas, problemas en el paladar, o incluso factores asociados a la conducta, como el hecho de dormir boca arriba que puede producir que la lengua caiga y produzca obstrucciones.

De manera que mientras el individuo está despierto los quimiorreceptores arteriales (CC), captan activamente las disminuciones de la PAO_2 y el incremento de la $PaCO_2$ y pH que compensan hiperventilando, pero cuando el individuo está dormido, especialmente en la fase REM, hay una disminución de la capacidad de detección de la disminución de PAO_2 y del aumento de la $PaCO_2$. Esta disminución de la sensibilidad y posibles alteraciones en el reflejo quimiorreceptor, unido a la atonía muscular que impide la restauración de la apertura de las vías aéreas, junto con otros factores predisponentes ya comentados (obesidad), agravan la situación producida por el AOS. También otros factores como tabaco, alcohol presencia de edemas favorecen la aparición de este

patología. Se puede concluir que la génesis del AOS es de tipo multifactorial, y la suma de los factores favorece que se desencadene el proceso (Somoza et al., 2015; Levy et al., 2015).

6 Fisiopatología del AOS: Hipoxia Crónica Intermitente

Como se ha indicado con anterioridad, las apneas repetitivas acaecidas en el AOS, producen una situación intermitente de disminución de la PaO_2 y un aumento en la $PaCO_2$.

Fletcher et al., (1995) fueron los primeros en demostrar experimentalmente la importancia de la HCl en el SAOS utilizando ratas al describir que en los animales sometidos exclusivamente a HCl se observaba el incremento en la actividad del SNS, que conducía al desarrollo de hipertensión. En el mismo estudio observaron que los episodios hipóxicos (que simultáneamente generan hipocapnia por la hiperventilación consecuente) eran los desencadenantes de la hipertensión pues al añadir CO_2 con la finalidad de transformar los episodios hipóxicos, en eucapnicos o moderadamente hipercapnicos, no se modificaba la hipertensión de la HCl hipocápnica. Estudios más recientes indican que, efectivamente, es el estímulo hipóxico intermitente y no el estímulo hipercápnico (Peng & Prabhakar, 2004) el que sensibiliza al CC y que puesto que el CC detecta las variaciones de la PO_2 se ha considerado como desencadenante del aumento del tono simpático y aumento de la presión arterial generada por la HCl a en pacientes con AOS (Cistulli & Sullivan, 1994; Narkiewicz et al., 1999). Estos hallazgos validan utilizar animales de experimentación a los que se someten a atmósferas en que la PO_2 oscila cíclicamente, para estudiar tanto el AOS como el SAOS simulando una HCl.

6.1 Efectos de la HCl en el CC

La HCl producida en el AOS tiene dos efectos principales en el reflejo quimiorreceptor: a) aumentar la respuesta a la hipoxia aguda en el CC y en los efectores del SNS, es decir un aumento de la sensibilidad al estímulo hipóxico (Rey et al., 2004; Peng & Prabhakar 2004), y b) aumentar la actividad basal del sensor y efector de manera duradera hasta cronificarse (facilitación a largo plazo: LTF) (Prabhakar et al., 2006).

En estos aspectos es importante comentar los experimentos del grupo de Prabhakar (ver Prabhakar et al., 2015 para referencias). Peng et al., (2003) en experimentos

realizados en rata observaron que la exposición a episodios de HI aguda previos, incrementaba respuesta del CC, medida como descargas en el NSC, ante cada uno de los episodios aplicados posteriormente. Además mostraron que el incremento de las descargas en el NSC de animales previamente expuestos a HCI, permaneció incluso después de que la exposición a la nueva hipoxia aguda hubiera terminado, mientras que en animales controles la activación de los CC disminuyó a niveles basales una vez que los episodios de HI aguda acabaron. Estos resultados indican que la HCI produce un aumento en la actividad nerviosa basal de los CC y de la respuesta ante la hipoxia que perdura más allá del estímulo hipóxico. El aumento de la sensibilidad ante la hipoxia en el CC así como el incremento mantenida en la actividad basal, son dependientes del tiempo de exposición a HI crónica, así como de la frecuencia del estímulo hipóxico. No se observaron los fenómenos de aumento de sensibilidad hasta el tercer día de exposición a HI crónica y se mantuvo hasta el décimo día. Tanto la sensibilización de los CC como el aumento basal que perdura en el tiempo de las descargas en el NSC, se revertieron posteriormente al exponer los animales tratados con HCI a condiciones normóxicas.

Esta reversibilidad de la sensibilidad de los CC y actividad en el NSC está de acuerdo con las observaciones realizadas en individuos que padecen AOS y siguen terapia con CPAP (Sommers et al., 1995), en los que se observa una disminución en la presión arterial. También apoyan estas conclusiones, la denervación del CC de roedores a los que se somete a HCI, presentan una disminución de la presión arterial (Lesske et al., 1997; Prabhakar et al., 2005) y por el contrario, episodios breves de hiperoxia en humanos, disminuyen la actividad simpática. (Kara et al., 2003). Estas observaciones llevan a la conclusión que la HCI aumenta la respuesta hipóxica de los CC debido a una sensibilización y LTF selectiva del CC lo que produce una activación del SNS.

Respecto a aspectos morfológicos la HCI aplicada en ratas no produce modificaciones significativas en los CC de rata sometidas a HCI excepto en el tamaño de los capilares (Peng et al., 2003; del Río et al., 2011).

6.1.1 Efectos generales reflejos originados en el CC

Las fibras sensoriales del NSC y que forman parte del arco aferente del reflejo quimiorreceptor ante la hipoxia son vehiculadas por el n. glossofaríngeo hasta el tronco

del encéfalo donde la información sensorial se integra en la parte comisural del NTS (Zhang & Mifflin, 1993; Chitravanshi & Sapru, 1995; ver Prabahakar et al., 2015), de ahí continuará a localizaciones entre ellas el núcleo paraventricular y la médula rostral ventrolateral que conducen a la activación del SNS y la activación de los músculos inspiratorios y dilatadores de las vías aéreas superiores, produciendo despertares, de manera que se superan la obstrucción y se restauran los gases sanguíneos. En un estudio reciente Moraes et al., 2013 refieren que una subpoblación específica de neuronas presimpáticas (no moduladoras de la ventilación) localizada en la médula rostral ventrolateral que reciben inputs desde los núcleos respiratorios que pueden contribuir al incremento de actividad simpática en la HCI.

De manera que los efectos consecuentes a la sensibilización y LTF del CC por la HCI y en consecuencia los dependientes de la participación del CC en SAOS, que se han demostrado tanto en humanos como en animales de experimentación (ver Prabhakar et al., 2015 para referencias) se pueden agrupar en:

1. Fragmentación del sueño por los despertares repetitivos que a su vez producen somnolencia, disconfort y ansiedad al día siguiente
2. Inestabilidad respiratoria e incremento del esfuerzo inspiratorio para superar la obstrucción. Estos esfuerzos originan importantes alteraciones de la presión torácica y cambios hemodinámicos que alteran el perfil de las oscilaciones de las presiones arteriales y tisulares de O₂, (Almendros et al., 2010; Prabhakar 2013)
3. Activación del reflejo simpático (Narkiewicz et al., 1997 & 1999; Prabhakar et al., 2006; Zoccal et al., 2008) que produce entre otros efectos la ya comentada hipertensión arterial sistémica. Por otra parte la HCI también afecta a otras estructuras del arco reflejo y activa la secreción de CA por la MA (Prabhakar et al., 2006; Nandury et al., 2015).

El papel importante de la estimulación simpática y de MA en la HCI se demuestra por la disminución en la presión sanguínea, así como una disminución en la liberación de CA tras la extirpación de la médula adrenal en ratas sometidas a HCI (Bao et al., 1997) o simpatectomía química con 6-OH Dopamina (Fletcher et al., 1992b).

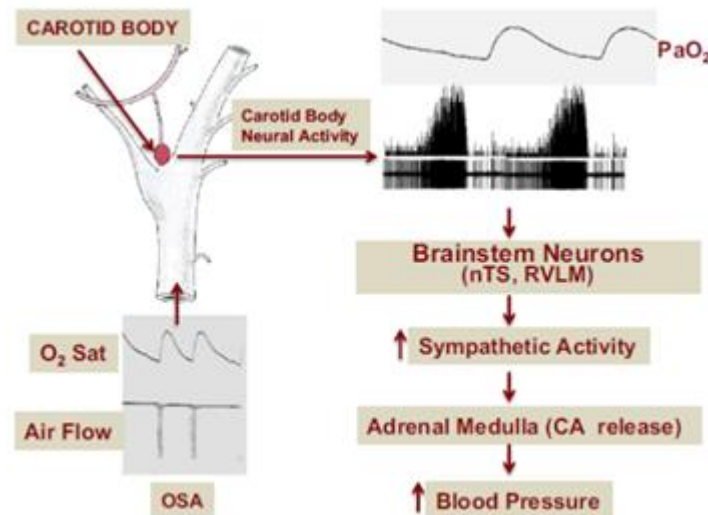


Figura 8. Contribución del reflejo quimiosensorial del CC a la hipertensión causada por la AOS. Tomado de J Nanduri et al., *J.Mol. Med* (2015) 93:473-480.

6.1.2 Mecanismos moleculares de la HCl en el CC y en el reflejo quimiorreceptor

La exposición repetida a procesos de hipoxia-reoxigenación durante la HCl es similar a la observada en procesos de isquemia-reperfusión. Durante la reoxigenación se produce un aumento en la producción de especies reactivas de O_2 (ROS), principalmente por medio de la Xantina oxidasa (Nanduri et al., 2013), El aumento de ROS conduce al incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, que finalmente lleva a un desequilibrio entre la síntesis de las isoformas de Hipoxia-Inducible Factor (HIF), que son críticos en la transcripción de enzimas prooxidantes ó antioxidantes (Nanduri et al., 2015).

Las isoformas HIF-1 y HIF-2 son heterodímeros con una subunidad β o constitutiva y una subunidad α regulada por O_2 . (ver Semenza 2012). En las células del CC (ver Prabhakar and Semenza 2012) se expresan ambas isoformas (Roux et al., 2005; Lam et al., 2008). La HCl aumenta los niveles de la isoforma HIF-1 α y disminuye la HIF-2 α (Lam et al., 2006; Nanduri et al., 2009). El HIF-1 es el factor de transcripción responsable, entre otras moléculas (EPO, VGF,...), de la síntesis de enzimas prooxidantes, como la NADPH oxidasa de tipo 2 (Nox-2), presente en el CC y en otros componentes del reflejo quimiorreceptor (NTS, médula rostral ventrolateral y MA) (Peng et al., 2009; 2014). El HIF-2 es un potente activador de genes responsables de la síntesis de enzimas antioxidantes como la SOD-2 (Scortegagna et al., 2003). Es decir, la HCl a través de

incrementar el cociente de HIF1/HIF2 (ver figura 9) favorece la síntesis de enzimas prooxidantes respecto a los antioxidantes y genera estrés oxidativo (Nanduri et al., 2015).

Los ROS generados por la actividad de Nox-2 (Peng et al., 2009), inhiben también la actividad del complejo I de la cadena mitocondrial, produciéndose de esta manera un aumento en la producción de ROS (los propios ROS aumentan la producción de mas ROS) (Khan et al., 2011).

El aumento del estrés oxidativo activa al CC, incrementando la liberación de neurotransmisores y las descargas en el NSC (Feng et al., 2008). También se ha descrito un incremento de la excitabilidad celular de las células glómicas mediada por el incremento de la inhibición de canales de K⁺ tipo TASK. (Ortiz et al., 2012). Apoyando un papel para el HIF1 en los cambios producidos en el CC ante la HCI se sitúan los estudios con ratones heterocigotos que demuestran la ausencia de la sensibilización y facilitación a largo plazo (LTF) en ratones *hif1a^{+/-}* (Peng et al., 2006). Sin embargo, a pesar de los resultados anteriores, el efecto directo de los ROS en el CC es fruto de controversia (Gómez-Niño et al., 2009; González et al., 2007).

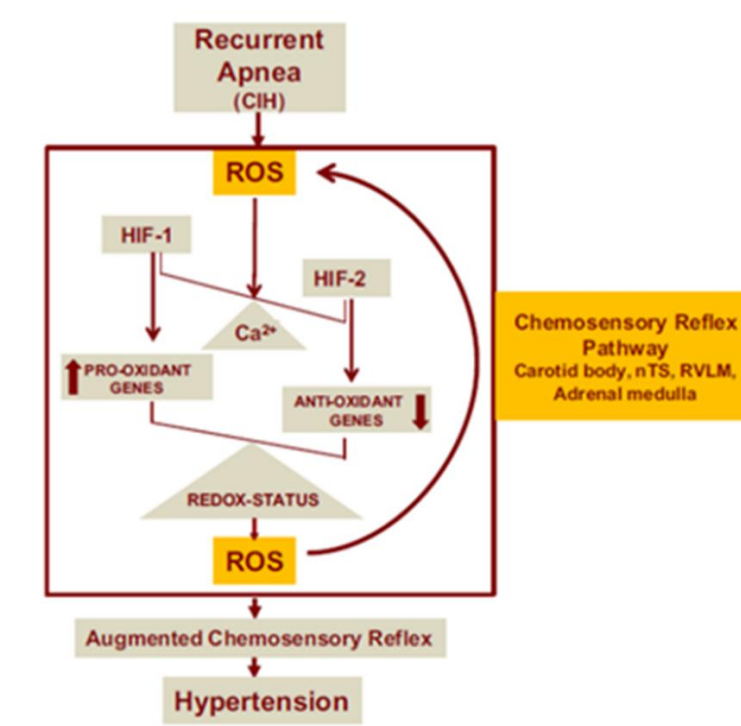


Figura 9. Esquema de la disregulación de HIF-1 y HIF-2 por HCI como resultado de apnea y la regulación positiva del reflejo quimiorreceptor del CC por ROS. Señalización por Ca²⁺, núcleo del tracto solitario (nTS), médula ventrolateral rostral (RVLM). (Tomada de Nanduri et al., 2015).

Otros elementos que participan del reflejo quimiorreceptor a la hipoxia se modifican ante la aplicación de la HCl tanto a nivel central (núcleos troncoencefálicos) como a nivel periférico (MA) y colaboran a la génesis de la hipertensión arterial (ver Prabhakar et al., 2015, Nanduri et al., 2015). Se ha demostrado que la HCl a través del incremento de ROS y posterior incremento de Ca^{2+} modifica los niveles de HIF cuyo desequilibrio en los niveles de las isoformas incrementa los niveles de ROS (ver figura 9). Estas modificaciones no suceden en la MA ante la ablación de los CC o tras su denervación, lo que implica la necesidad de la activación del CC, origen del reflejo quimiorreceptor, para que se activen estos mecanismos en la MA que a su vez originen el incremento de secreción de CA. Recientemente se ha publicado que el desequilibrio de las isoformas de HIF en la MA se debe al incremento de Ca^{2+} intracelular que se genera tras la actividad del nervio esplácnico mediada por la activación del receptor muscarínico por la acetilcolina en las sinapsis de la MA (Peng 2014; Kumar et al., 2015).

Otros estudios también realizados en modelos animales sustentan un papel para endotelinas, angiotensina, 5-HT y citoquinas proinflamatorias en los efectos de la HCl en el CC. Se ha propuesto a la endotelina 1 (ET-1) como responsables de la sensibilización del CC ante la HCl y a 5-HT y angiotensina en la LTF.

La ET-1 es un péptido vasoactivo que presenta bajos niveles en el CC en normoxia aunque su aplicación en el CC incrementa la actividad quimiorreceptora de manera importante actuando a través del receptor ETA (Chen et al., 2000). Estudios realizados por el grupo de Iturriaga en gato (Rey et al., 2007; 2008), y rata (Del Rio et al., 2011) muestran que la HCl aumenta la expresión de ET-1 en células glómicas del CC y que antagonistas del receptor de la ET-1 suprimen la sensibilización del CC por HCl (Rey et al., 2007; 2008). Otros autores en CC de rata no ven incremento de la expresión del precursor de ET-1 si no de la activación de la enzima convertidora de preproendotelina 1 (ECE) y con ello los niveles de ET-1 ante la HCl que son suprimidas con el uso de antioxidantes (Peng et al., 2013), lo que indica que el incremento de ROS por la HCl es el responsable del incremento de ET-1 en el CC. Por otra parte se ha demostrado que la HCl, produce la liberación de la ET-1, y el incremento de la expresión ETA y contribuye a la sensibilización a la hipoxia del CC (Peng et al., 2013). Estudios en rata indican que existe un incremento en la expresión de ET-1 durante la primera semana de HCl,

retornando posteriormente a niveles basales, y proponen que la ET-1 contribuiría a la sensibilización del CC en las primeras etapas de exposición a HI (del Río et al., 2011).

En la zona próxima al CC donde se encuentran los barorreceptores del Seno Carotídeo, (mecanorreceptores que se activan ante la distensión de la pared arterial) y en consecuencia se activan por el incremento de la presión arterial, también se ha demostrado el incremento de ET-1 y de la actividad ECE. Además se ha demostrado que en ratas expuestas a HCI la respuesta de los barorreceptores se reduce y que la aplicación de antagonistas del receptor ETA previene dicha reducción. Se ha propuesto que la ET-1 además de ser responsable de la sensibilización del reflejo quimiorreceptor ante la hipoxia también produciría la aminoración del reflejo barorreceptor, lo que originaría una mayor respuesta simpática ante la aplicación de hipoxias posteriormente a la aplicación de HCI. De acuerdo con lo anterior, en individuos con AOS y en modelos animales de HCI además de un aumento en la actividad de los quimiorreceptores se ha demostrado una disminución de la sensibilidad de los barorreceptores y ambos participarían en la hipertensión consecuente (Lai et al., 2006, Peng et al., 2012).

Por último la HCI también produce un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias en el CC como interleuquina-1 β (IL-1 β), interleuquina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y factor nuclear (NF- κ B). Sin embargo estas citoquinas proinflamatorias no influyen en la sensibilización de la respuesta hipóxica tras exposición a HCI como demuestra que la sensibilización se mantiene después de la administración de ibuprofeno (Iturriaga et al., 2014) lo que no parece indicar un gran protagonismo de la inflamación.

En relación a la LTF, el CC expresa cantidades sustanciales de 5-HT y de angiotensina II, esta última se sintetiza en el CC por una vía independiente de renina. Ambas sustancias se ha propuesto como mediadores de este proceso pues su aplicación espaciada produce un importante efecto de LTF en el CC (ver Prabhakar et al., 2015). Se ha propuesto que la HCI también vía ROS produce un aumento de angiotensina II y de sus receptores (Lam et al., 2014).

En conclusión, ya se ha comentado algunos aspectos que relacionan HCI con la producción de ROS en el arco reflejo que se origina en el CC. Así los ROS se han asociado

con aumento de: a) el reflejo quimiorreceptor del CC en animales expuestos a HCl afectando a nivel de neurotransmisión (Peng et al., 2009; 2013), canales iónicos (Ortiz et al., 2012) en el CC, b) excitabilidad neuronal en el Troncoencéfalo (Kline et al., 2007; Peng et al., 2014), y c) la secreción de CA por la MA (Kumar et al., 2006; Souvannakitti 2010; Nanduri et al., 2015). También se ha observado que el tratamiento con scavengers de ROS de animales previamente expuestos a HCl (ver Nanduri 2015), inhiben: a) la sensibilización de la respuesta del CC a la hipoxia, b) la activación del LTF (Peng et al., 2003; 2009; 2013), c) el aumento de la secreción de CA de la MA y d) la hipertensión arterial (Kumar et al., 2006). Estos estudios indican que el incremento en la generación de ROS es un mecanismo, por el que el reflejo quimiorreceptor del CC contribuye al incremento de la activación simpática y la consecuente hipertensión producida por la HCl intermitente (Nanduri et al., 2015).

6.2 Efectos de los mecanismos moleculares de la HCl independientes del CC y de la activación del simpático

Además del arco reflejo quimiorreceptor que se origina en el CC y que genera la activación del simpático, la HCl también actúa sobre estructuras periféricas de manera más directa e independiente de las modificaciones en el reflejo quimiorreceptor que se origina en el CC. La importancia relativa de los mecanismos dependiente e independiente del CC y de la activación simpática es objeto de controversia como se demuestra en polémica mantenida por Kohler et al., 2012 vs Lavie et al., 2012 en *Journal of Physiology*.

Entre los mecanismos independientes de la activación del reflejo quimiorreceptor, un grupo numeroso de autores (ver Almendros et al., 2014; Levy et al., 2015) han propuesto a la disfunción endotelial (DE) como uno de los responsable de las alteraciones cardiovasculares en la SAOS. De hecho, la DE se relaciona con el aumento de rigidez arterial es una característica de los enfermos con SAOS (Fava et al., 2011) y se observa en pacientes con dicho síndrome, incluso con una mínima evidencia de patología cardíaca (Parati et al., 2007).

La DE consiste en la adquisición por el endotelio de un fenotipo procoagulante, proadhesivo y vasoconstrictor y se ha postulado que el estrés oxidativo, la inflamación y las disregulaciones metabólicas son los factores fundamentales en su génesis.

Es decir, dentro de las alteraciones cardiovasculares los mecanismos que operan en la HCl para producir hipertensión sistémica se pueden agrupar en los mediados por: 1. la activación del reflejo simpático originado en el CC y 2. el estrés oxidativo, la inflamación y las disrregulaciones metabólicas que afectan a los vasos periféricos.

En relación con el estrés oxidativo generalizado, diversos estudios señalan un aumento de distintos biomarcadores de estrés oxidativo en plasma, orina, aire exhalado y células provenientes de pacientes con SAOS (Prabhakar et al., 2007). Por otra parte, se ha demostrado que la disminución en la capacidad vasodilatadora de la arteria braquial en pacientes con SAOS (Grebe et al., 2006), se recupera con tratamientos antioxidantes, sugiriendo que el estrés oxidativo contribuye a incrementar el tono vascular en dichos pacientes

Según hemos explicado previamente durante la HCl debido al fenómeno de hipoxia/reoxigenación se produce el incremento de ROS y la activación de los mecanismos de la inflamación de forma generalizada. Los mecanismos que producen el incremento de ROS de forma generalizada (\uparrow HIF1, \downarrow HIF2, \uparrow NOX2 y \downarrow SOD) durante la HCl son los mismos que operan en el CC y ya han sido tratados en el apartado 6.1.2. Por lo tanto sólo vamos a tratar aquellos mecanismos y aspectos que no se han tratado en dicha sección por su menor importancia.

Un mecanismo desencadenante de la DE en el SAOS, derivaría de la disminución de la disponibilidad de óxido nítrico (NO) que se ha relacionado con una fase precoz de la aterogénesis. El NO que es un potente vasodilatador se sintetiza a partir de L-arginina en un proceso dependiente de O_2 , y la HCl observada en pacientes con AOS, influenciaría de manera directa su síntesis en el endotelio vascular (Leeman et al., 1999). Así en un estudio, realizado en cultivos de células endoteliales, en el que se medía de manera directa la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), la enzima fosforilada (P-eNOS), distintos marcadores inflamatorios y marcadores de estrés oxidativo se observó que la expresión tanto de eNOS como de P-eNOS fue menor en células endotelial provenientes de individuos con AOS que en las de sujetos controles, mientras que la expresión de marcadores tanto de estrés oxidativo como de inflamación fue mayor y estos efecto se revierten por CPAP (Jelic et al., 2008).

En cuanto a los mecanismos que disminuyen su producción en la HCl, los ROS producidos por NOX2 inhiben directamente la expresión de óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS,) y median la proliferación de las células musculares lisas de los vasos inducidas por CA producto de la estimulación del reflejo quimiorreceptor. Además los $O_2^{\cdot-}$ producidos reaccionan con el escaso óxido nítrico (NO^{\cdot}) y produce peroxinitrito ($O_2^{\cdot-} + NO^{\cdot} \rightarrow ONOO^{\cdot}$) neutralizando, por tanto, la actividad biológica del NO^{\cdot} y contribuyendo a la génesis de la hipertensión (González et al., 2007). El $ONOO^{\cdot}$ nitrosila residuos de tirosina en las proteínas (formando nitrotirosina) alterando su función, como ocurre con la aconitasa mitocondrial. De hecho, en vasos cutáneos de pacientes con SAOS se observa un alto nivel de nitrosilación (Jelic et al., 2010). Otra hipótesis para explicar la disminución en la producción de NO^{\cdot} sería la existencia de elevados niveles de inhibidores endógenos de eNOS como análogos estructurales de la arginina en la HCl (derivados metilados) (Ohike et al., 2005).

Además del NO^{\cdot} el endotelio también produce sustancias vasoconstrictoras como la ET-1 o la angiotensina y sus niveles parecen aumentar en individuos con AOS e influyen en su hipertensión asociada (Grimpen et al., 2000).

Muchas células responden al incremento de ROS que se produce en la HCl como consecuencia de los repetidos ciclos de hipoxia-reoxigenación aumentando la regulación del factor de transcripción NF- κ B que juega un papel fundamental en la respuesta inflamatoria (Almendros et al., 2014). En este contexto HIF-1 α es un factor que puede modular NF- κ B (Gorlach & Bonello 2008). El factor de transcripción NF- κ B, regula el aumento de la transcripción de varios genes proinflamatorios responsables de la síntesis de citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-6 e IL-8), quimioquinas, moléculas de adhesión y enzimas como ciclooxigenasa-2 (COX-2), además NF- κ B puede activar células endoteliales, leucocitos y plaquetas que expresan las moléculas de adhesión y citoquinas proinflamatorias que contribuyen a la DE y otras patologías cardiovasculares relacionadas con la HCl (Bosc et al., 2010). Así, Citoquinas inflamatorias como TNF- α e interleuquina-8 (IL-8) inducen expresión de moléculas de adhesión relacionadas con los procesos aterogénicos en el AOS (Dyugovskaya et al., 2003; Kritchevsky et al., 2005).

Teniendo en cuenta la relación entre SAOS e inflamación se ha tratado de utilizar biomarcadores plasmáticos de la inflamación para la valoración de este proceso y su relación con este síndrome. La PCR es un biomarcador de inflamación sistémica que se ha descrito como marcador de riesgo en enfermedades cardiovasculares y se sintetiza principalmente en el hígado bajo la regulación de factores pro-inflamatorios principalmente IL-6 (Kent et al., 2011). Se ha asociado el incremento de sus niveles séricos a SAOS pero sin embargo los resultados obtenidos en AOS son dispares en cuanto a su reversión por CPAP lo que determina dudas sobre su participación en la patogenia del SAOS (Yokoe et al., 2003 & Iesato et al., 2007) vs Mehra et al., 2006; ver Kent et al., 2011; Buloukaki et al., 2015).

Por último en el endotelio vascular también producen alteraciones directas o mediadas por oxidación de LDL. Las LDL oxidadas constituyen el principal sustrato de las placas de ateroma. En células endoteliales aisladas las LDL oxidadas inhiben la expresión de eNOS, disminuyen la captación de arginina (precursor de NO[•]) y, además aumentan la concentración de dimetil arginina asimétrica (ADMA), (Zhang et al., 2008), un inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS).

7 Revisión de las bases moleculares del estado oxidativo.

A la vista de la importancia que tiene el estrés oxidativo sobre la génesis de las patologías del SAOS, voy a desarrollar una breve exposición sobre que es el estrés oxidativo, los radicales libres y su generación, biomarcadores del daño oxidativo y que mecanismos responsables de su eliminación. Esta sección tiene como objetivo una mejor comprensión de la metodología utilizada para lograr nuestros objetivos.

7.1 Estrés oxidativo. Conceptos generales

El estrés oxidativo está producido por un desequilibrio entre la producción de radicales libres en especial de especies reactivas de oxígeno (ROS), y la capacidad de un sistema biológico de eliminar con rapidez los reactivos intermedios, o reparar el daño resultante. En términos químicos, el estrés oxidativo es un aumento del potencial de reducción celular o una gran disminución en la capacidad reductora de los pares redox celulares.

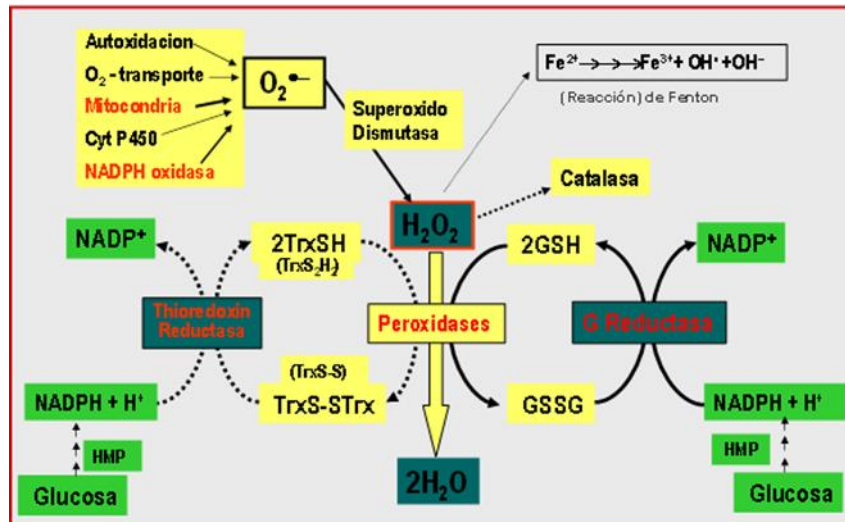


Figura 10. Fuentes principales de especies reactivas de oxígeno y mecanismos de eliminación.

Los radicales libres se definen desde un punto de vista químico como átomos o moléculas que presentan uno o más electrones desapareados en su orbital más externo, haciéndolos de esta manera mucho más reactivos que su forma no radical (Punchard and Kelly 1996; Halliwell and Gutteridge 2007). Los ROS aparecen como productos del metabolismo aerobio, en la figura 10 muestro en esquema general de las fuentes de producción y mecanismos de desaparición con los que cuentan las célula.

De ellos los que presentan un mayor interés desde el punto de vista biológico, son las especies reactivas del O_2 también conocidas como ROS y en menor medida las especies reactivas del nitrógeno o RNS.

7.2 Especies reactivas del O_2 , tipos y vías de producción

Los principales ROS, radicales derivados del O_2 , que cualitativamente y cuantitativamente juegan un papel importante en biología y en medicina son: el estado singlete del oxígeno O_2^* , el anión superóxido $O_2^{\bullet-}$, el radical hidroxilo OH^* , incluimos en este grupo .el peróxido de Hidrogeno H_2O_2 que no es un radical libre, pero que es el precursor del radical hidroxilo OH^* .

7.2.1 Anión superóxido $O_2^{\bullet-}$

Si se añade un electrón a la molécula de O_2 en su estado fundamental, entra en uno de los orbitales p^* antibonding. El producto que se obtiene es el radical superoxido, con un único electrón desapareado. Es considerado como el ROS primario y del cual derivan los siguientes ROS. Puede producir dismutación enzimática o espontánea y generar

H₂O₂, es el precursor de la formación del radical OH• catalizada por metales de transición,

Se origina en diferentes reacciones metabólicas, la principal fuente de producción, en los organismos aerobios, excluyendo a las células fagocitarias, ocurre en la cadena transportadora de electrones (CTE) en la mitocondria (Cadenas & Sies 1998). Se estima que alrededor de un 1-3% del O₂ que se consume en la respiración mitocondrial en condiciones de PaO₂ normal, escapa como O₂^{•-}. Este escape electrónico se produce principalmente a nivel de los complejos I o III (Turrens 2003; Muller et al., 2004; Chen et al., 2005), como producto de la reducción incompleta del átomo de O₂ por medio de un electrón, No se descarta que el complejo II también participe su producción (Gredilla et al., 2001).

Además de en la mitocondria, en otros compartimentos celulares y extracelulares pueden producirse reacciones de autooxidación, en las que moléculas biológicamente importantes como la tirosina y CA (dopamina, epinefrenia...) y triptófano, reducen lentamente al O₂ a O₂^{•-}. El O₂^{•-} a su vez es capaz de oxidar a otras moléculas propagándose el daño oxidativo, con resultados adversos para la integridad celular. Debido al gran contenido de aminas biógenas que posee el CC, la contribución de estas reacciones para generar ROS, en este tipo de células podría ser cuantitativamente importante.

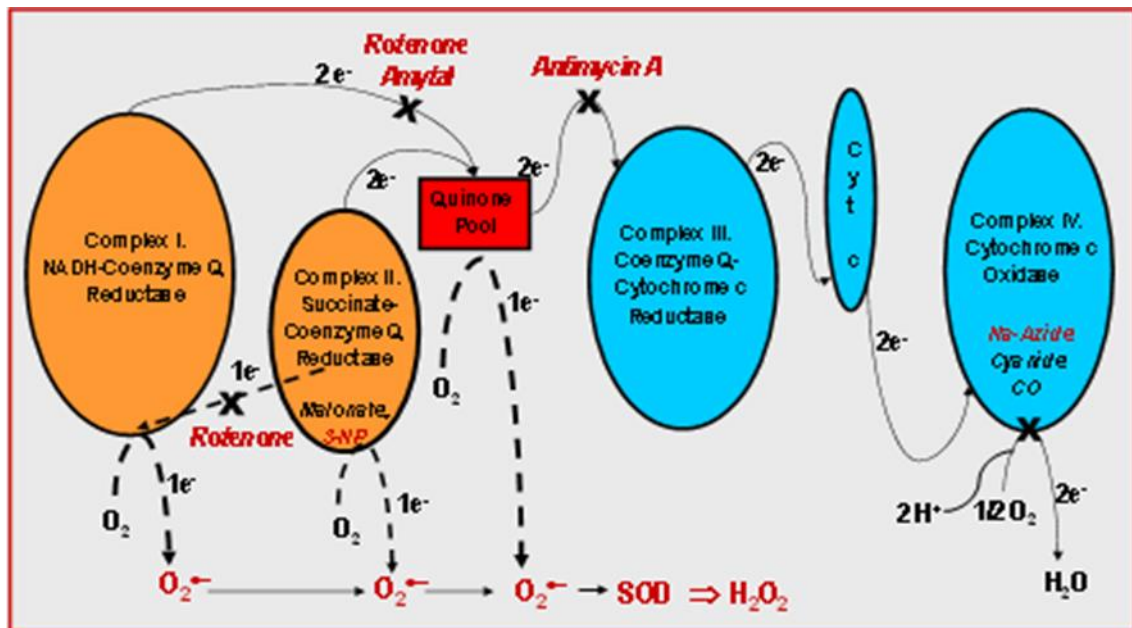
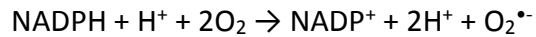


Figura 11. Esquema general de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTE). En el esquema aparecen los lugares en los que pueden generarse $O_2^{\bullet-}$; los inhibidores de CTE, se muestran en rojo.

Los eritrocitos, que participando en el transporte de O_2 , parte del O_2 transportado puede ser susceptible de transformarse en $O_2^{\bullet-}$. En condiciones normales, un pequeño porcentaje de la oxihemoglobina, alrededor de un 2-3% se oxida (Fe^{2+} pasa a Fe^{3+}) y el producto resultante Metahemoglobina (MetHb) ya no puede ligar O_2 . Los eritrocitos disponen de sistemas enzimáticos y no enzimáticos para evitar la oxidación del Fe^{++} y para restablecer la capacidad transportadora de oxígeno (GSH, superóxido dismutasa (Cu-ZnSOD), glutatión peroxidasa (Gpx), Methemoglobina reductasa).

El retículo endoplasmático liso, contiene enzimas implicados en la hidroxilación y oxidación de moléculas, estos enzimas P_{450} y B_5 , emplean citocromos, como sistemas de transporte de electrones y pueden generar $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 . La biosíntesis de eicosanoides es también una fuente de $O_2^{\bullet-}$.

Otra fuente importante de producción de ROS son las producidas por el complejo enzimático, altamente organizado, la NADPH oxidasa (NOX), enzima que se encuentra en células fagocíticas, neutrófilos, monocitos y macrófagos, siendo el uso del $O_2^{\bullet-}$ en este caso como agente bactericida frente a patógenos externos. Cataliza la siguiente reacción:



En la actualidad se sabe que las NOX constituyen una familia de enzimas que incluyen 7 isoformas NOX 1, 2, 3, 4 y 5 Duox1 y 2 que se expresan y localizan en una gran diversidad de tipos celulares y son la fuente mas importante de ROS. En el endotelio vascular, músculo liso vascular, se encuentra la isoforma NOX2, que produce la mayoría de especies reactivas de oxígeno y juega un papel importante en el daño vascular y en la patofisiología de la hipertensión. (Sinha et al., 2015)

Otra vía principal de producción del $\text{O}_2^{\bullet-}$ es la producida por enzimas citosólicos, entre ellos se encuentran la familia de enzimas Xantina Oxidorreductasa que una vez sintetizada puede encontrarse en dos formas una como Xantina deshidrogenasa (XDH, EC 1.1.1.204) que tiene capacidad de reducir al O_2 y al cofactor NAD^+ y otra como Xantina oxidasa (XO E.C. 1.1.3.22) que solamente reduce el O_2 . Ambas catalizan las reacciones de transformación de la hipoxantina en xantina y por último en ac. Úrico.

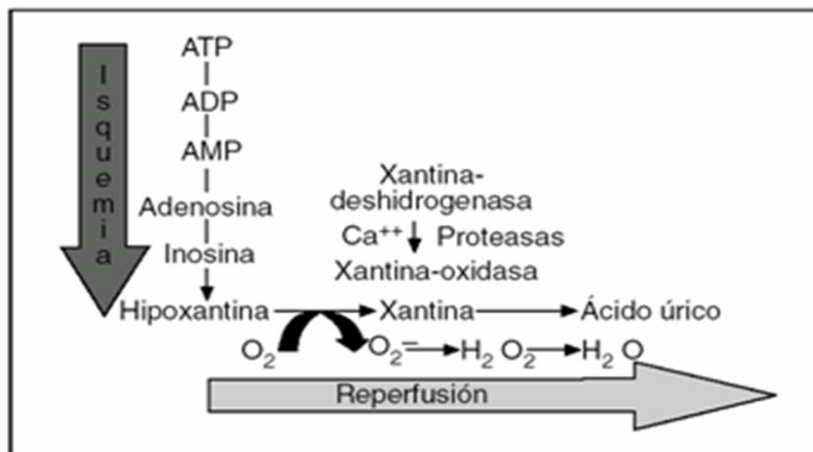


Figura 12. Mecanismo de actuación de la xantina oxidoreductasa en situaciones de isquemia reperfusion.

En los procesos de isquemia reperfusion, La depleción celular de ATP, debido a la isquemia, produce un aumento de Ca^{2+} citosólico, produciendo la activación de proteasas dependientes de Ca^{2+} , que transforman la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa la cual producirá como subproducto $\text{O}_2^{\bullet-}$ que posteriormente se transformará en H_2O_2 .

7.2.2 *Peróxido de hidrógeno H₂O₂*

Se produce a partir de la dismutación del radical O₂^{•-} por medio de la enzima superóxido dismutasa (SOD), es soluble en lípidos y puede difundir a través de membranas ya que presenta carga neutra, no es un radical libre, ya que no posee electrones desapareados pero dada su capacidad oxidante y la formación, en el espacio extracelular, del anión OH[•], mediante la reacción de Fenton (Fenton 1894), hace que se le incluya dentro de los ROS. La reacción de Fenton se muestra a continuación.



7.2.3 *Radical hidroxilo OH[•]*

Es la forma neutra del ión hidróxido (OH⁻). Además de generarse en la reacción de Fenton, también puede producirse por la descomposición del peroxinitrito ONOO⁻, así como por la ruptura homolítica del H₂O o por medio de radiaciones ambientales. Es una molécula altamente reactiva que reacciona con distintas moléculas a una velocidad solamente limitada por su difusión, posee una vida media muy corta 1*10⁻⁹ seg. Es altamente tóxico y ataca a la mayoría de los componentes celulares. El OH[•] como resultado de las reacciones con distintas biomoléculas, da lugar a una segunda generación de radicales libres amplificando de esta manera el daño oxidativo. Principalmente ocurre en los lípidos de las membranas, en las cuales el OH[•] extrae un átomo de hidrogeno de los ácidos grasos poliinsaturados, formando una molécula de H₂O, el ácido graso atacado, se transforma en un radical carbonado capaz de reaccionar con el O₂ molecular, formando radicales peroxilos (R-COO[•]-COOH) captando estos últimos otros átomos de hidrogeno de las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados próximos, propagando y amplificando de esta manera la alteración lipídica, en lo que se denomina lipoperoxidación o peroxidación lipídica (LPO).

7.2.4 *Peroxinitrito ONOO⁻ (RNS)*

Formado por la reacción del anión O₂^{•-} con el anión nitroxilo (NO[•]), este último proveniente de la reducción de óxido nítrico (NO[•]). El ONOO⁻ es un compuesto liposoluble que actúa como agente oxidante y nitrante cuya protonación forma ácido peroxinitroso ONOOH, que puede sufrir homólisis produciendo una molécula de radical hidroxilo (OH[•]) y una molécula de dióxido de nitrógeno (NO₂).

El ONOO⁻ produce graves daños en el metabolismo celular como la activación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) que interviene en la disfunción vascular en gran número de enfermedades, nitración de residuos de tirosina en proteínas, la oxidación del complejo Zn-tiolato en la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) (Beckman & Koppenol 1996), o la oxidación de la tetrahidrobiopterina.

La reacción del NO[•] con el O₂^{•-} esta favorecida, ya que ocurre a una velocidad mayor que la propia dismutación del O₂^{•-} por la superóxido dismutasa.

7.3 Biomarcadores de daño oxidativo

Para evaluar el daño oxidativo general, que los organismos sufren a lo largo de un proceso, podemos cuantificar una serie de parámetros que interpretamos como huellas dactilares. Unas son moléculas sencillas de fácil valoración, otras son mas complejas que implican técnicas sofisticadas, valoraciones enzimáticas....

Como ejemplo, el total estado antioxidante del plasma, se mide como un indicador del estado antioxidante general de un individuo (Dhamrait et al., 2004). Sin embargo el mayor inconveniente de su uso es que en los ensayos utilizados para evaluar el estado total antioxidante, de los fluidos biológicos, el principal contribuyente es el ac. Úrico (>50%) sin embargo el urato tiene muy poca importancia como antioxidante in vivo (Young, 2001).

7.3.1 LPO

Los Isoprostanos, son compuestos semejantes a prostaglandinas producidos primariamente a partir de la oxidación del ac. Araquidónico por ROS y RNS. Se ha dicho que son “gold standard” para la medida del estrés oxidativo (Uno & Nicholls, 2010), sin embargo sus métodos de valoración deberían de estar estandarizados y no se está de acuerdo como hacerlo (Halliwell & Lee, 2010).

Las sustancias que reaccionan con ac. Tiobarbiturico (TBARS) y el malonaldehido (MDA) y 4-hidroxinonenas (4-HNE) (Lykkesfeldt, 2007; Niki, 2009), son los que se utilizan comúnmente aunque los métodos que los valoran no están exentos de controversia, por ejemplo por carecer de especificidad, por formación posterior a la recogida de muestras de MDA, por la presencia de antioxidantes que pueden interferir con el procedimiento de ensayo. Estas moléculas son los productos finales de la

peroxidación lipídica (LPO) o lipoperóxidos (LPOs). Una de las principales causas del daño celular producido por el estrés oxidativo, se da a nivel de las membranas celulares, con la destrucción de la estructura lipídica que conforma las mismas. Los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados presentes en los fosfolípidos de las membranas, son muy susceptibles a la acción de los radicales libres, produciendo la fragmentación de los ácidos grasos, formando hidroperóxidos y aldehídos citotóxicos. Los radicales hidroxilo y perhidroxilo pueden atacar de nuevo a los ácidos grasos insaturados de las membranas produciendo su peroxidación y fragmentación, de esta forma los niveles de peróxidos lipídicos representan un indicador del ataque a las membranas celulares (Halliwell & Gutteridge 2007). La intensidad del ataque oxidativo se determina valorando los niveles de LPOs medidos como MDA y 4-HNE.

El mecanismo de la peroxidación lipídica se realiza en tres pasos: ver esquema en Fig. 13

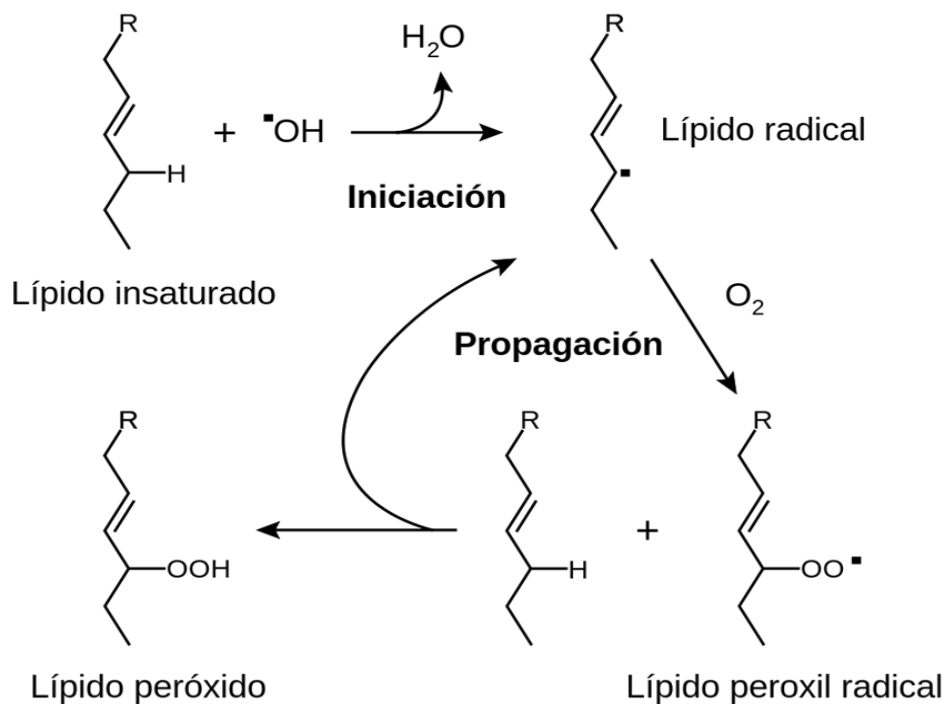


Figura 13. Peroxidación lipídica. Etapas de iniciación, propagación y terminación.

Iniciación de la peroxidación lipídica: en ella un radical libre ataca a un carbono de la cadena alifática de un ácido graso, tomando un hidrógeno del grupo metileno ($-\text{CH}_2-$),

de un carbono adyacente al doble enlace de un ácido graso poliinsaturado, con la formación del radical alquílico (R[•])

Propagación: se produce una reacción en cadena, con la extensión del daño y la formación de más especies radicalarias.

Finalización: La reacción radical se detendrá cuando dos radicales reaccionan y producen una especie no radical. Esto ocurre solamente cuando la concentración de especies radicales es lo suficientemente alta como para que exista la probabilidad de que se encuentren dos radicales. Los organismos han evolucionado diferentes moléculas que aceleran el proceso de terminación atrapando radicales libres, protegiendo de esta manera la membrana celular. Dos radicales libres reaccionan y se termina la reacción en cadena, los hidroperóxidos formados se descomponen en diversos alcanos, cetonas y aldehídos reactivos. Los aldehídos formados, como el MDA y el 4-HNE, pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, lo que determina diversos efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos. La presencia de MDA y el 4-HNE, en los medios biológicos constituyen un buen marcador de daño oxidativo (Lykkesfeldt 2007; Niki 2009).

Estos marcadores descritos anteriormente presentan desventajas, y no son verdaderamente un índice absoluto de daño oxidativo. En la actualidad están emergiendo biomarcadores mas creíbles. Por ejemplo, dimetilarginina asimétrica (ADMA), un inhibidor endógeno de NOS (Boger et al., 1998; Boger, 2006) aumenta en condiciones de estrés oxidativo, lo cual puede por último conducir a disfunción endotelial.

También puede valorarse daño oxidativo midiendo derivados oxidados de bases nitrogenadas (8-HO dguanosina y 8-HO guanosina) y en extractos nucleares tisulares la relación de eteno derivados de las bases: Etenoadenosin/etenocitidin (De Bont & van Larebeke 2004), el daño en proteínas midiendo nitrosilación y glutationilación.

7.3.2 Disminución de la actividad de la enzima aconitasa mitocondrial

La aconitasa (aconitato hidratasa; EC 4.2.1.3.) es la enzima catalizadora de la isomerización de citrato a isocitrato via cis-aconitato en el ciclo de Krebs. Es una enzima con un peso molecular 84 KDa, tiene un grupo prostético ferro-sulfurado que reacciona

directamente con el sustrato. Un modelo tridimensional y esquema del núcleo Fe-S puede verse en la Fig 14.

El centro activo tiene una estructura tetraédrica $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$, en la que 3 residuos de azufre de Cys se unen a 3 átomos de hierro, mientras que el cuarto átomo de hierro al no estar coordinado por Cys, lo hace más lábil y susceptible a ataque oxidativo, principalmente por el anión O_2^- . Este ataque oxidativo al hierro no ligado a Cys, hace que el centro activo se transforme en inestable, con la consecuente pérdida del átomo de hierro, inactivándose el grupo prostético y transformándose la estructura a $[3\text{Fe-4S}]^{+1}$ (Cantu et al., 2009), según la ecuación:

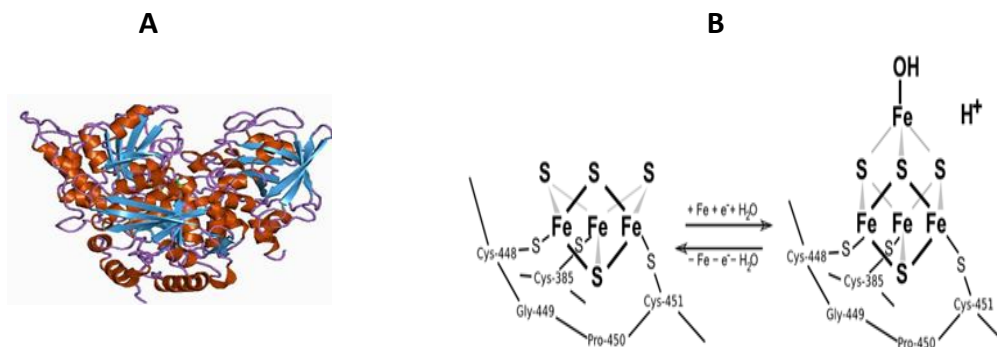
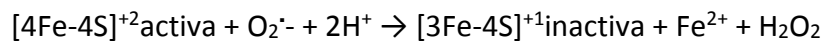


Figura 14. A) modelo tridimensional de la enzima aconitasa B) detalle del Centro activo de la aconitasa, en el que se muestra el cluster Fe-S. Esquema de su activación y desactivación por eliminación de Fe.

La mitocondria es la mayor fuente de ROS donde hasta un 3% del O_2 consumido es reducido a O_2^- (Cadenas et al., 1977; Imlay et al., 1991). En eucariotas existen dos isoformas de aconitasa, una situada en la matriz mitocondrial y otra citosólica, siendo la isoforma mitocondrial la que cataliza la isomerización del citrato a isocitrato en el ciclo de Krebs. Debido a su proximidad al sitio de generación del anión O_2^- en la mitocondria, y a su capacidad de ser inactivada por el ataque oxidativo, hace de la disminución de la actividad de la aconitasa sea un potente bioindicador del daño oxidativo a nivel mitocondrial.

7.4 Sistemas de eliminación de los ROS (antioxidantes)

Un antioxidante es una sustancia con función biológica que incluso a concentraciones muy bajas respecto al sustrato oxidable, disminuye o evita la oxidación de este sustrato

ya que actúa como un agente reductor más potente (Halliwell et al., 1995). Desde el concepto de potencial normal bioquímico se considera antioxidante una sustancia cuyo potencial normal de reducción es más negativo que el de la sustancia oxidable (€o'antioxidante<€o'sustrato oxidable). Los principales sistemas antioxidantes se pueden clasificar según su estructura y función en sistemas no enzimáticos y enzimáticos.

7.4.1 *Sistemas no enzimáticos: Glutación*

Es un tripéptido formado por los aminoácidos L-cisteína, ácido L-glutámico y glicina, de fórmula γ -glutamil-cisteinil-glicina. Se sintetiza en el citosol a través del ciclo del γ -glutamilo por lo que es el principal antioxidante soluble. Aparece en altas concentraciones del orden milimolar, principalmente en el citosol (hasta 11 mM), pero también en núcleo o mitocondria. La parte activa de la molécula es el grupo tiol (grupo SH) de la cisteína, con capacidad para ceder o aceptar protones (H^+). Al ceder electrones y equivalentes de reducción, el propio glutación se transforma en una sustancia reactiva, que reacciona con otra molécula de glutación reactivo formando el disulfuro de glutación (GSSG). De esta manera pasa de estado reducido GSH al estado oxidado GSSG, para posteriormente por medio de la enzima glutación reductasa regenerar el GSH a partir del GSSG. El hecho de que dos moléculas de glutación al oxidarse reaccionen entre si formando el GSSG, se debe a la alta concentración de glutación en el citoplasma celular. (Ver Fig.15)

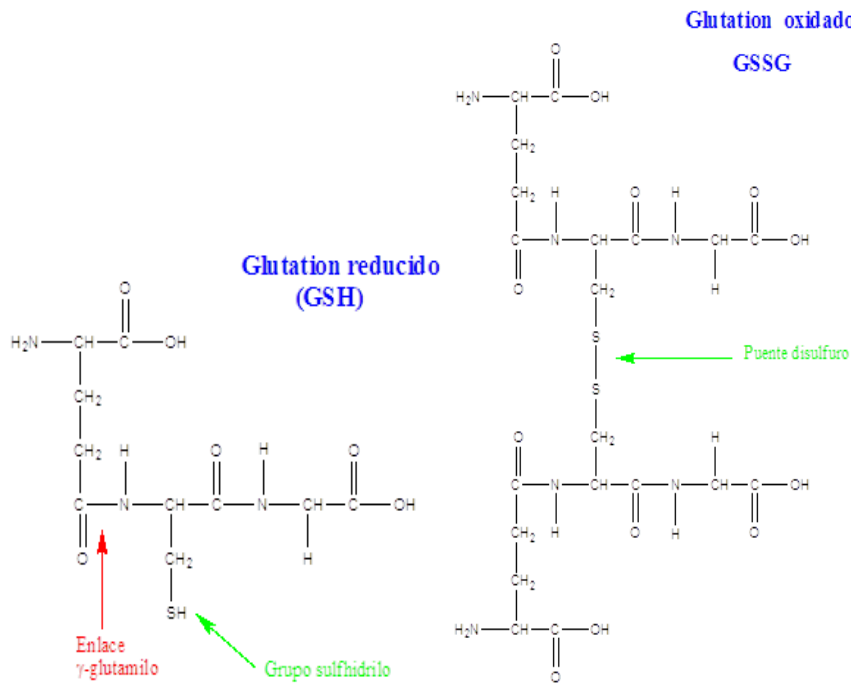


Figura 15. Fórmula del Glutation reducido (GSH) y oxidado (GSSG) con su enlace disulfuro característico.

En las células y tejidos sanos, más del 90% del glutatión total está en la forma reducida (GSH) y menos del 10% en forma de disulfuro (GSSG). Debido a ello y al potencial redox del GSH, se evita las variaciones bruscas del estado redox celular, ya que debido a las altas concentraciones de GSH actúa como tampón redox, necesitándose una gran producción de radicales libres, para alterar el equilibrio oxidativo en la célula. Un aumento de la proporción GSSG/GSH se considera una señal de estrés oxidativo. En esta situación debido a un incremento brusco en la producción de ROS, aumenta la concentración de GSSG respecto GSH, disminuyendo este último, originando una situación de estrés oxidativo en la célula que a temperatura fisiológica (37º centígrados), disminuye el potencial redox del par glutatión $[GSH]/[GSSG]$ según indica la ecuación de Nernst:

$$\text{Estado redox (mv)} \approx E_{GSH} = -240 - 30,7 \times \text{Log} \frac{[GSH]^2}{[GSSG]}$$

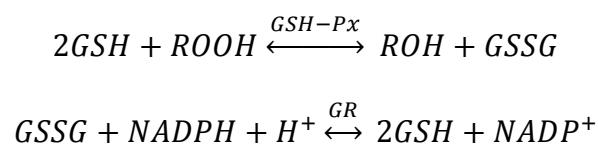
Hay que considerar que cuando se produce un aumento brusco en la velocidad de producción de ROS y aumenta la concentración de GSSG, este tiende a salir de la célula, evitando con ello una excesiva acumulación y concentración celular de GSSG y con ello una situación de colapso del estado redox (Schafer et al., 2001).

7.4.2 *Sistemas antioxidantes enzimáticos.*

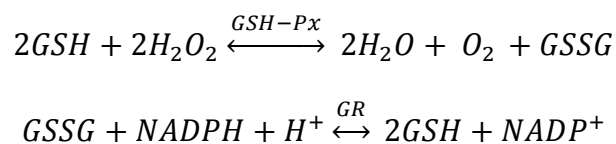
Glutación peroxidasa GPx (E.C. 1.11.1.9)

Enzima homotetramérica, en la que cada subunidad contiene un residuo de selenocisteína, al igual que la catalasa utiliza el H₂O₂ como sustrato. La GPx también reacciona con lípidos e hidroperóxidos orgánicos, una vez que las enzimas lipasas los liberan de las membranas o lipoproteínas. Utiliza para ello el glutatió reducido (GSH), que es transformado en glutatió oxidado (GSSG), protegiendo de esta manera a la célula del daño oxidativo. Posteriormente el GSSG es reciclado de nuevo a GSH por la reacción catalizada por la glutatió reductasa (GR) que utiliza como dador de electrones el NADPH.

Reacción de la GPx utilizando lípoperóxidos como sustrato:



Reacción de la GPx utilizando H₂O₂ como sustrato:

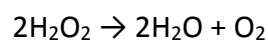


Existen al menos cinco isoenzimas de la GPx en mamíferos, cuya localización varía dependiendo del tejido

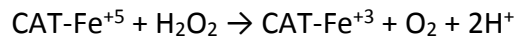
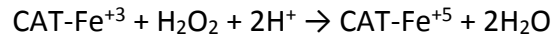
Catalasa, CAT (E.C. 1.11.1.6.)

Es un homotetrámero con disposición tetraédrica, con cuatro grupos de ferroprotoporfirina, de 60 KDa por subunidad, se localiza en los peroxisomas, utilizando como cofactores el grupo hemo y el manganeso.

Cataliza la descomposición del peróxido de hidrogeno en agua y oxigeno mediante la reacción:



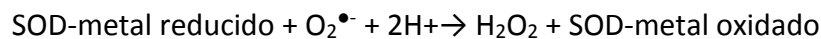
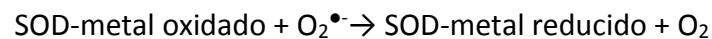
La reacción ocurre en 2 pasos:



Es un enzima altamente eficiente no pudiendo ser saturada por su substrato a ninguna concentración (Kirkman et al., 1999), con dadores de hidrogeno como metanol, etanol, ácido fórmico, fenoles etc., actúa con actividad peroxidasa.

Superóxido dismutasas SOD (E.C.1.15.1.1.)

Son metalo enzimas que pueden tener como metal de coordinación Mn (MnSOD) o Cu-Zn (Cu-Zn SOD). Catalizan la dismutación del anión $\text{O}_2^{\bullet-}$, convirtiéndolo en H_2O_2 . En la reacción de dismutación el metal actúa secuencialmente cediendo y aceptando un electrón con el resultado de la eliminación de dos moléculas de $\text{O}_2^{\bullet-}$ y generándose una molécula de H_2O_2 y otra de O_2 mediante la reacción:



Existen tres isoformas de SOD dependiendo de su localización: SOD citosólica (SOD-1, CuZnSOD), es un homodímero de 32 KDa, donde el metal que actúa como dador y receptor de electrones es el cobre, actuando el zinc como elemento estabilizador de la enzima. Se encuentra de forma mayoritaria en el citosol de las células, aunque también puede aparecer en el núcleo y en el espacio intermembrana mitocondrial (Lindenau et al., 2000; Sturtz et al., 2001). Representa aproximadamente el 90% del contenido total de SOD.

SOD mitocondrial (SOD-2, Mn-SOD), es un homotetrámero de 96 KDa que contiene un átomo de manganeso (Mn) en cada subunidad. El Mn cambia su estado de oxidación de Mn (III) a Mn (II) para pasar de nuevo a Mn (III) en el proceso de dismutación del $\text{O}_2^{\bullet-}$. Se localiza en la mitocondria y constituye la primera barrera defensiva contra el daño oxidativo, ya que la fuente principal de $\text{O}_2^{\bullet-}$ se localiza en la CTE mitocondrial. La expresión de la Mn-SOD es fundamental para el mantenimiento de la vida y el desarrollo de resistencia frente a las especies reactivas de oxígeno.

SOD extracelular (SOD-3, ECSOD), contiene cobre como metal catalítico y zinc como elemento estabilizador del centro activo. Se encuentra en la matriz extracelular y en fluidos extracelulares como un homotetrámero glicosilado. Su distribución tisular es importante debido a la naturaleza altamente oxidante del sustrato y su localización está relacionada con el lugar de producción del $O_2^{\bullet-}$ con el fin de eliminar su toxicidad (Petersen et al., 2004).

8 Síndrome de apnea obstructiva del sueño (SAOS).

Ya hemos comentado en la sección 3 que con los años el AOS genera una serie de patologías asociadas que se agrupan en el denominado SAOS. De manera que el AOS está asociado a una gran morbilidad y mortalidad (Pack 2006) pues además de acarrear los efectos deletéreos de la propia apnea lleva asociado complicaciones cardiovasculares, metabólicas y neuropsiquiátricas (Chiang et al., 2006; Almendros et al., 2010; 2014; Somoza et al., 2015; Levy et al., 2015) que se muestran en la tabla I.

También hemos comentado que el principal factor desencadenante de las afecciones del SAOS es la HCl característica del AOS (Fletcher et al., 1992a; 1995). Es importante añadir que dependiendo de la duración e intensidad HI así serán los efectos favorables (entrenamiento de deportistas) o deletéreos producidos por la HCl y asimilados al SAOS (Almendros et al., 2014) y que la eliminación de la HCl con CPAP mejora el conjunto de la sintomatología (Martínez-García et al., 2010; Levy et al., 2015).

Tabla I. Patologías asociadas al AOS que conforman el SAOS (modificada de Chiang et al., 2006).

Patología cardiovasculares (Kato et al., 2009; Lurie, 2011)	Hipertensión sistémica. Fallo cardíaco. Enfermedad coronaria Arritmias Ictus
Patologías neuropsiquiátricas (Saunamaki & Jehkonen, 2007; Gozal, 2013)	Ansiedad, depresión, somnolencia déficits cognitivos, atención, demencias cefaleas y alteraciones causadas por ictus
Patologías metabólicas (Coughlin et al., 2004; Vgontzas et al., 2005; Conde et al., 2014)	Intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina Diabetes Mellitus tipo II Síndrome metabólico
Otras Patologías	Reflujo gastro-esofágico Genitourinario (nocturia, disfunción sexual. Toxemia durante el embarazo

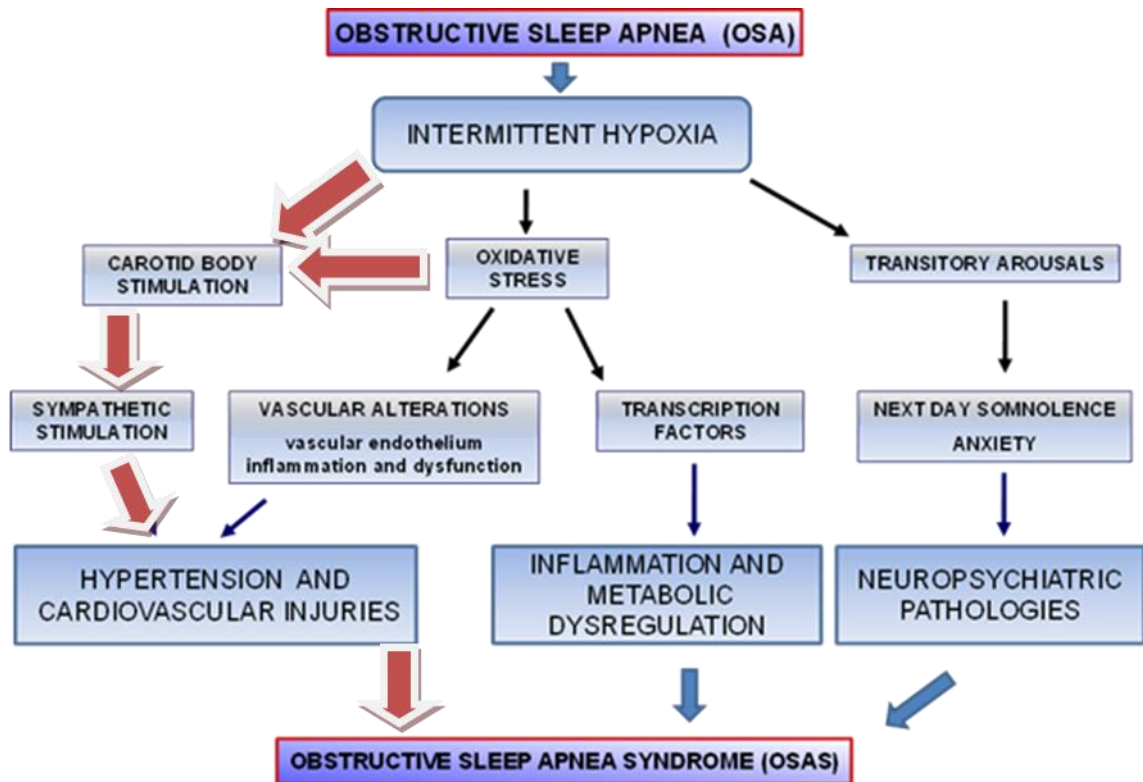


Figura 16. Fisiopatología de las alteraciones asociadas a la AOS para conformar el SAOS. Las flechas de color rojo indican la vía dependiente de la activación del CC.

En individuos sanos, cuando se pasa del estado de vigilia al de sueño, la actividad vagal aumenta produciendo una disminución de la actividad nerviosa simpática, disminuyendo con ello la presión arterial y el ritmo cardíaco que sin embargo no ocurre en los pacientes con AOS, que sufren: 1. hiperactividad del SNS originada en el CC 2. estrés oxidativo generalizado 3. activación de vías inflamatorias, 4. DE y 5. disregulación metabólica. En la figura 16 se muestra de manera incompleta y a modo de resumen los mecanismos patogénicos (dependiente de la activación del CC e independiente), que conducen a las tres grandes áreas que agrupan las patologías del SAOS.

8.1 Patologías cardiovasculares asociadas al SAOS: hipertensión sistémica.

De las patologías cardiovasculares asociadas al SAOS sólo nos vamos a ocupar de la hipertensión pues es la alteración fundamental en el SAOS y ha sido la alteración del SAOS objeto de nuestra investigación.

La hipertensión se genera en AOS y en los modelos de HCI y de manera multifactorial. En este apartado trataremos de compendiar y reunir los aspectos que consideramos

importantes en referencia a su patogenia aunque en apartados anteriores hemos ido describiendo algunos de ellos.

La HCI y los continuos microdespertares, causados por las repetitivas obstrucciones presentes en pacientes con AOS, producen un aumento en el tono simpático que conduce a la hipertensión (Zoccal et al., 2007). Como se indicó con anterioridad, la actividad del simpático aumenta progresivamente con la duración de cada episodio apnéico, y en el momento de la restauración de la respiración, tras un microdespertar, se produce un aumento del ritmo cardíaco, aumentando la presión en los vasos sanguíneos, ya comprimidos por la acción vasoconstrictora del SNS, aumentando con ello de forma abrupta la presión arterial (Parati et al., 2007). La activación del simpático permanece durante el día, incluso en condiciones en las que los niveles de O₂ y CO₂, son normales aumentando con ello la presión sanguínea durante las horas diurnas.

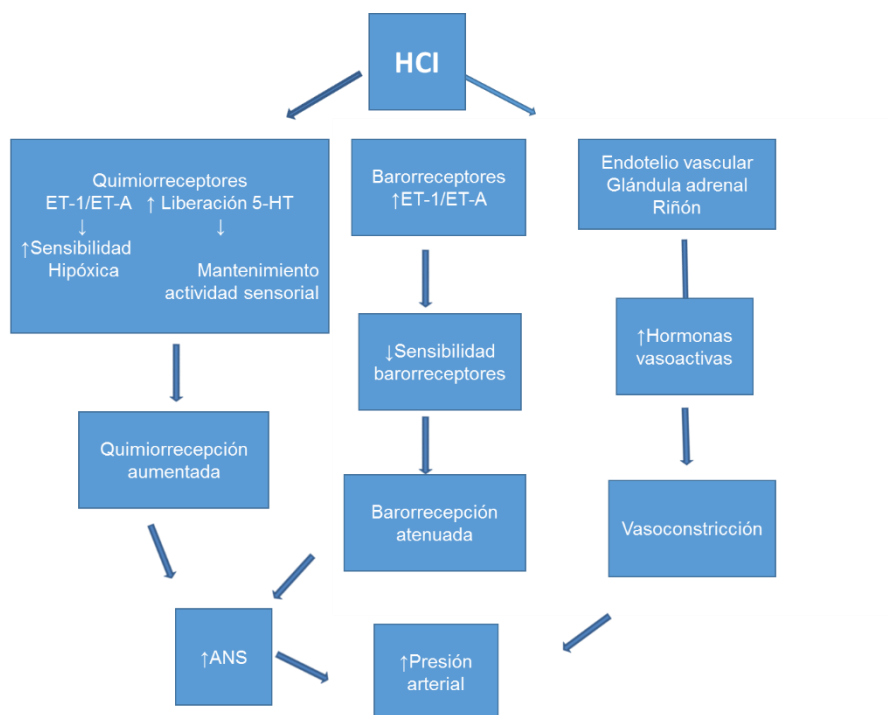


Figura 17. Representación esquemática del mecanismo propuesto para el aumento de la presión arterial sistémica. (HI) hipoxia intermitente, endotelina-1 (ET-1), receptor de endotelina A (ET_A), serotonina (5-HT), actividad del nervio simpático (ANS). (Prabhakar & Kumar, 2010).

En la figura 17 tomada de Prabhakar y kumar 2010) se muestra que la HCI produce hipertensión a través de la sensibilización y LTF de los quimiorreceptores del CC, de la atenuación del reflejo barorreceptor y de la actuación de sustancias vasoactivas sobre

las resistencias vasculares (ET-1, CAs y Angiotensina II). HCI activa la función quimiorreceptora e inhibe los barorreceptores y se ha propuesto que el balance entre estos estímulos opuestos tenga un efecto principal en la activación persistente del SNS y en consecuencia en la génesis de la hipertensión (Peng et al., 2012). Otros mecanismos que afectan a la DE incluyen las hormonas vasoactivas circulantes.

La prevalencia de hipertensión en individuos con AOS se estima que puede llegar a alcanzar hasta el 50% del total (Banno et al., 2007; Kato et al., 2009). Se estima que hasta el 83% de individuos hipertensos que presentan resistencia a tratamiento padecen AOS (Logan et al., 2001). Estudios realizados por el Wisconsin Sleep Cohort (Young et al., 1997) y Sleep Heart Health (Nieto et al., 2000), señalaron que la presión arterial aumentó de forma lineal en relación con el incremento del índice AHI.

Se ha propuesto que la obesidad es un factor de riesgo importante en el desarrollo de hipertensión en individuos con AOS aunque la hiperactividad del simpático en el AOS es independiente de la obesidad pues aparece también en individuos con un índice de masa corporal dentro de lo normal. Por todo lo anterior se ha considerado al AOS como una causa independiente en el desarrollo de hipertensión (Peppard et al., 2000).

8.2 Epidemiología de SAOS: relación con envejecimiento.

En términos generales la relación del SAOS y la edad resulta compleja, si bien la edad promedio de los pacientes que son diagnosticados de AOS ronda los 50 años (Young et al., 2002 b), en individuos de mayor edad los síntomas propios de la enfermedad podrían pasar inadvertidos debido a una falta de atención hacia esos síntomas. Así, la somnolencia diurna como síntoma característico de la apnea del sueño, es considerada como algo normal en individuos de edad avanzada. También las patologías cardiovasculares asociadas al AOS van perdiendo su asociación con el AOS a medida que avanza la edad, aunque el índice de masa corporal aumenta con la edad y con ello los trastornos metabólicos que se asocian al AOS (Banno et al., 2007; Wills et al., 2011;). De manera que se puede concluir que en los individuos >65 años la prevalencia de SAOS es mayor que en individuos más jóvenes pero que la sintomatología del saos es mas florida en los individuos de mediana edad que en los mayores de 65 años.

En estudios que comparan la mortalidad de pacientes con edad avanzada (>65 años) con AOS con individuos que no lo padecen, se observó que paradójicamente, los individuos que padecían AOS tuvieron una menor mortalidad, incluso con una mejora en los pacientes con un AOS moderado. Llevando a la conclusión que el SAOS ofrece algún tipo de protección, sugiriendo que el estrés oxidativo de alguna forma disminuye. (Lavie et al., 2009 a).

No hay estudios que relacionan la génesis de AOS y SAOS en modelos animales de diferentes edades a los que se ha aplicado HCl. Sin embargo nuestro grupo ha publicado un estudio en el que hemos observado que la respuesta quimiorreceptora ante la hipoxia es menor en las ratas viejas (Conde et al., 2006) lo que podría indicar alguna relación de causalidad.

8.3 Importancia socio-sanitaria de la apnea obstructiva del sueño

Consideramos relevante presentar algunos datos epidemiológicos que ponen de manifiesto la importancia socio-sanitaria del SAOS. El SAOS afecta entre el 3,5 al 6% de la población adultos aumentando linealmente con la edad (Young et al., 2002 a; ver Banno et al., 2007). Los pacientes con SAOS sufren una frecuencia de accidentes de tráfico 3 veces mayor que la población control, (Teran-Santos et al., 1999) presentan el doble de absentismo, un menor rendimiento laboral y su costo sanitario-días de hospitalización/año es ligeramente superior al doble de los controles de la misma edad (Martínez-García et al., 2010). Junto a estos datos de naturaleza económica podemos añadir que: 1) Más del 60% de los pacientes con SAOS son hipertensos frente al 20% de la población control (Kyzer and Charuzi 1998); 2) el 50% de los pacientes con accidentes vasculares cardíacos y cerebrales agudos que ingresan en los hospitales padecen SAOS, lo que indica que son 3-5 veces más frecuentes que en la población control de la misma edad (Berger & Lavie, 2011); 3) la frecuencia de alteraciones cognitivas-demencias es 4.5 veces más frecuente en pacientes con alteraciones del sueño que en los controles de las mismas edades, estando dichas alteraciones ligadas a disfunciones vasculares (Elwood et al., 2006); 4) se encuentra que aún con criterios restrictivos (IAH>30), el 26% de los hombres y el 21% de las mujeres de >70 años presentan SAOS; constatándose una correlación estrecha entre HAI y disfunción endotelial, valorada mediante análisis del flujo sanguíneo en la arteria radial (Martínez-García et al., 2010).

En su conjunto, estos datos ponen de manifiesto que el SAOS es, por su alta prevalencia, morbilidad y mortalidad asociada, un proceso sanitario de gran importancia en el que la HCl es el principal generador de las patologías cardiovasculares asociadas y contribuyen de manera fundamental a las alteraciones metabólicas y neuropsiquiátricas.

8.4 Tratamiento del AOS.

Existen diversas opciones para tratar el AOS, entre ellas se incluyen cambios en la postura del sueño (evitando dormir en posición supina), pérdida de peso, eliminación de la ingesta de alcohol y diversos procedimientos quirúrgicos y aplicaciones orales (Parati et al., 2007; Pagel. 2007) que se detallan a continuación:

CPAP (Continuous positive airway pressure): son las siglas en inglés de presión positiva continua en la vía aérea, es la terapia más efectiva y ampliamente utilizada. La CPAP bombea aire bajo presión hacia la vías respiratorias, manteniéndolas abiertas durante el sueño previniendo los episodios de colapso ver Fig 18. El uso del CPAP produce una disminución en la frecuencia de los episodios apnéicos y de la desaturación de O₂ durante el sueño (Engleman et al., 1993), así como una disminución de la actividad del SNS durante la noche, junto con una disminución de la presión arterial sistémica (Narkiewicz et al., 1999 b), reduciendo con ello la mortalidad debido a causas cardiovasculares (Marin et al., 2005; Doherty et al., 2005). El tratamiento con CPAP además mejora los problemas neuropsiquiátricos asociados al AOS, reduce la somnolencia y con ello el número de accidentes de tráfico y laborales, influyendo de esta manera en una mejora de la calidad de vida (Al-Barrak et al., 2003).

A pesar de los efectos beneficiosos el CPAP tiene algunos efectos adversos como sequedad de boca y nariz, estornudos, goteos y congestión nasal, algunas personas sienten claustrofobia y por ello produce despertares, no tolerando el tratamiento durante toda la noche (Banno et al., 2007).



Figura 18. Individuo con mascarilla nasal de CPAP (Continuous positive airway pressure), para el tratamiento de la apnea del sueño.

Aplicaciones orales: es un tratamiento menos invasivo utilizado en pacientes seleccionados. La aplicación oral mueve la mandíbula hacia delante incrementando el tamaño de las vías aéreas, mejorando la sintomatología de la patología. Aunque en algunos casos la mejoría es mayor que con el uso del CPAP, en términos generales su efectividad es menor que la conseguida con el uso del CPAP.

Tratamientos quirúrgicos: consisten en dos tipos de procedimientos. El primero, se trata de aumentar las vías aéreas con procedimientos como el avance mandibular o la uvulopalatofaringoplastia que mejora en individuos con obstrucciones orofaríngeas, aunque sus beneficios son cuestionables. El segundo procedimiento consiste en cirugía bariátrica, con la finalidad de conseguir una reducción de peso en pacientes con obesidad mórbida, disminuyendo con la pérdida de peso en estos pacientes, los efectos adversos del AOS, ya que como se ha indicado con anterioridad existe una estrecha relación entre AOS y obesidad (Banno et al., 2007).

Tratamientos farmacológicos: en ellos se utilizan tratamientos antihipertensivos para disminuir la presión arterial sistémica. Como consecuencia del aumento de actividad del SNS causado por el AOS, se ha propuesto a cerca de los efectos beneficiosos en el tratamiento de la hipertensión causada por el AOS, con la administración de fármacos bloqueantes adrenérgicos (Kraiczi et al., 2000), aunque aparecen datos a su favor, no parecen lo suficiente concluyentes para su uso (Parati et al., 2007).

Objetivos

De la introducción se desprenden varios hechos importantes en el Síndrome de Apnea Obstructiva del Sueño (SAOS) en los que se enmarcan nuestros objetivos:

1. La apnea obstructiva del sueño (AOS), se describe como la obstrucción recurrente de las vías aéreas superiores durante el sueño (20-40 segundos de duración cada obstrucción), causando episodios hipóxicos asociados a las obstrucciones. El AOS afecta a cerca del 3-7% de la población adulta, con un incremento significativo de la frecuencia, que incluso llegan a más que duplicar esos datos en edades superiores a los 60-65 años. En su evolución, el AOS se asocia frecuentemente con patologías cardiovasculares, metabólicas y neuropsiquiátricas, definiendo el síndrome de la apnea obstructiva del sueño (SAOS), aunque este es clínicamente menos evidente en pacientes de edad avanzada. Todo ello supone el hecho que los mecanismos patogénicos del SAOS pueden ser diferentes en pacientes de distintas edades.
2. La hipoxia Crónica intermitente (HCI) es el factor desencadenante de los mecanismos que llevan a las patologías asociadas, por lo que de manera consecuente los modelos experimentales del SAOS más utilizados consisten en la exposición de animales a episodios de hipoxia intermitente. En estos modelos los animales de laboratorio son expuestos de forma cíclica a atmosferas hipóxicas que conllevan la disminución de la PaO_2 y la consecuente desaturación de O_2 producida en cada obstrucción de las vías aéreas en los pacientes.
3. Los mecanismos generadores de las patologías del SAOS son controvertidos. Estos mecanismos se pueden agrupar en mecanismos que se originan en el Cuerpo Carotídeo (CC), por tanto son fundamentalmente dependientes del CC y que conducen a la activación del simpático y en mecanismos independientes de la activación del CC y que tienen como efectores los sistemas periféricos afectados. En la activación de ambos mecanismos se han propuesto una función relevante al incremento de especies reactivas de O_2 (ROS) producidas por la HCI. Sin embargo la contribución de ambas vías y el papel del incremento de ROS es origen de una amplia controversia.

En este contexto se centran los dos objetivos principales de esta tesis doctoral:

1. Contribuir a aclarar si efectivamente la producción de ROS está ligado a la patogénesis del SAOS. Para resolver esta controversia, hemos expuesto ratas a dos diferentes intensidades de HCl (ciclos de 10 ó 5 % O₂, 40s, y después 21% O₂, 80s; 8h/día, durante 15días). Una vez realizado este protocolo, medimos el reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG), los peróxidos lipídicos (LPO), el cociente de las actividades de los enzimas aconitasa y fumarasa, y la disponibilidad de las enzimas detoxificantes de los ROS en tejidos hepático, pulmonar y cerebral. También se midieron los niveles hepáticos del factor nuclear NF-κB-p65 y niveles plasmáticos de la proteína C reactiva.
2. Aclarar los mecanismos responsables por los cuales en los pacientes mayores con SAOS la sintomatología es menos grave. Para este objetivo también utilizaremos modelos animales de HCl que mimetizan el AOS en los que observaremos si se reproduce una menor afectación en ratas viejas. Se comparará los efectos de la HCl en ratas jóvenes (3-4 meses) y viejas (22-24 meses), sobre la batería de parámetros enunciados en el objetivo 1 y sobre la presión arterial sistémica que es una de las alteraciones fundamentales del SAOS.

Material y métodos

1 Animales de experimentación.

Todos los experimentos realizados en el presente trabajo, se han llevado a cabo utilizando ratas macho de raza Wistar, de dos edades diferentes: 3-4 meses (3M), tiempo en el que se considera que las ratas alcanzan el estado adulto, y 22-24 meses (24M) de edad para las ratas consideradas viejas o de edad avanzada. Los animales fueron mantenidos en el *vivarium* de la Universidad en condiciones controladas de humedad y temperatura, sometidas a ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y con libre acceso a alimentación (*ad libitum*). Una semana antes de iniciar los protocolos experimentales, los animales fueron llevados a una habitación donde se mantuvieron en las mismas condiciones.

Todos los protocolos experimentales, excepto la exposición a HCl y los registros pletismográficos fueron llevados a cabo en animales anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/Kg peso corporal) administrado ip. La sangre se extrajo por punción directa en el corazón. El recuento eritrocitario se realizó en un clitómetro de flujo Advia (Bayer AG, Leverkusen, Alemania). En el manejo de animales seguimos las normas The European Community Council Directive del 24 Noviembre 1986 (86/609/EEC) para el cuidado y manejo de animales. Los animales fueron eutanizados con una sobredosis intracardiaca de pentobarbital sódico. El comité institucional de la Universidad de Valladolid para el cuidado y uso de animales aprobó el protocolo.

Los experimentos se realizaron durante la mañana (desde las 8:30 a las 11 AM) del día después de la última exposición a HCl. Los animales se mantuvieron durante dos meses con alimentación y fotoperiodo controlado (12L:12O), las últimas dos semanas, el grupo correspondiente era sometido al protocolo de HCl correspondiente. Ver Fig 19.

Para los tratamientos previos a los experimentos, dividimos a las ratas de 3 meses en 4 grupos (2 controles y 2 experimentales), y a las ratas de 22-24 meses en 2 grupos (control y experimental), en total 6 grupos

Los grupos 5 y 6, ratas de edad avanzada, 22-24 meses, la semana 0 sería en este caso 80 ó 88 semanas de edad.

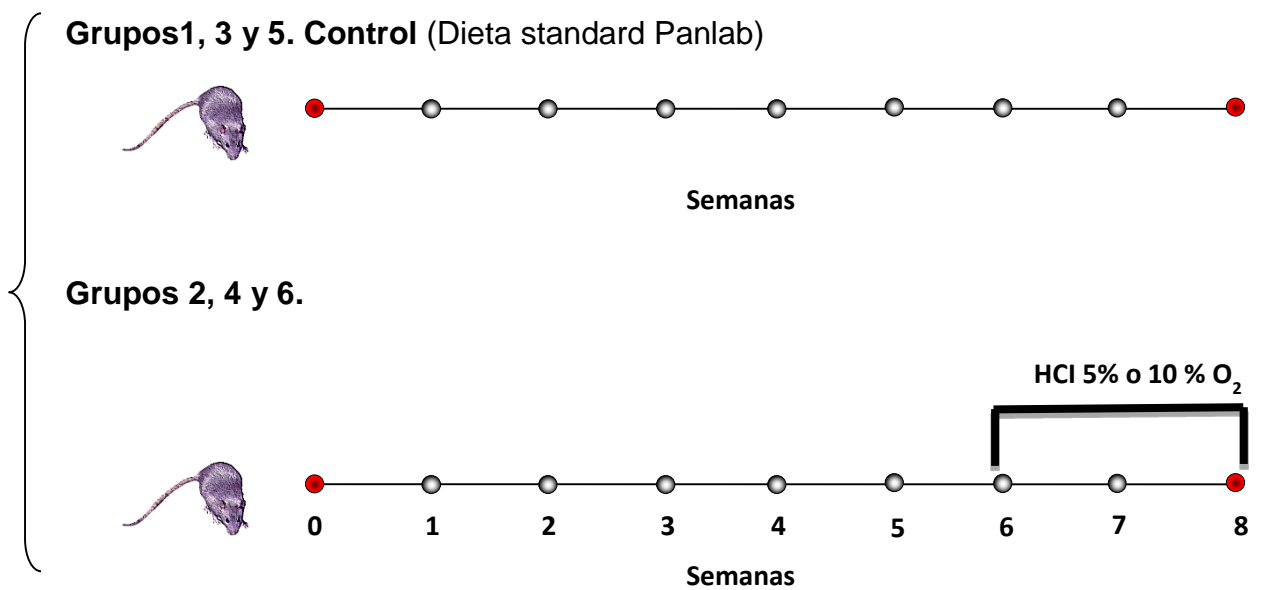


Figura 19. Esquema del protocolo experimental utilizado.

2 Hipoxia intermitente (HI). Dispositivo y sistema utilizado

Los experimentos se realizaron en un cuarto especial adaptado para dicha finalidad. Las cámaras empleadas para la HI son de metacrilato transparente, tienen unas dimensiones de 34 x 28 x 20 cm (16 litros de volumen) y se cierran herméticamente. En ellas se introdujeron 4 ratas por cámara con libre acceso a comida (A04, Panlab SL, Barcelona, España) y H₂O dentro de la cámara. Cada cámara tiene una entrada para el gas y en el lado opuesto hay dos aberturas, una donde se sitúa un oxímetro (Sensor Oxyding, Drager, Lübeck, Alemania) que permite monitorizar la PO₂ en el interior de las cámaras y otra para la salida de los gases sin permitir el incremento de la presión atmosférica.

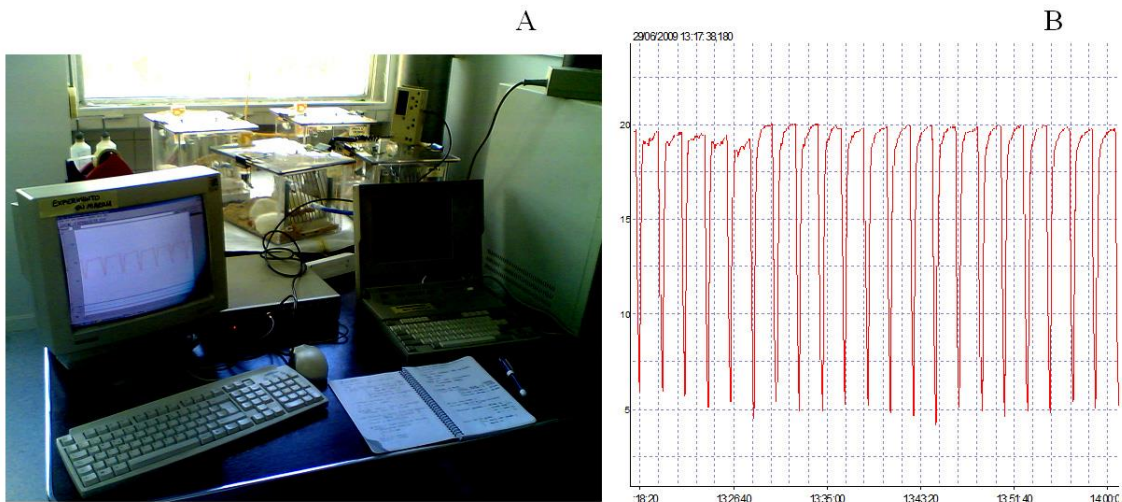


Figura 20. A) Cámara para someter a los animales de experimentación a episodios rítmicos de hipoxia intermitente. B) registro del ritmo y porcentaje de O₂ dentro de la cámara. Se representan 15 episodios, en 30 min (un episodio de hipoxia de duración 40 seg cada 2 min)

El flujo y composición deseada de gases se consigue mediante un sistema compuesto por 2 partes:

1. Un sistema de 3 válvulas que controlan la apertura y cierre de una mezcla de gases (aire y N₂) según el momento del ciclo en el que se encuentre el experimento. Con la válvula 1 se consigue que en el punto más bajo del ciclo se llegue a una hipoxia del 10 ó del 5% de O₂ según sea necesario. La válvula 2 está conectada a una bala de aire de alto flujo, que permite restablecer en el menor tiempo posible la situación de normoxia (20-21 % de O₂) y la válvula 3, es la encargada de mantener ese porcentaje hasta el comienzo del siguiente ciclo.
2. Un sistema de control compuesto por un oxímetro conectado a una de las cámaras, cuyo registro es llevado a un programa de adquisición de datos que nos permite visualizar en tiempo real los cambios en el porcentaje de O₂, que ocurren en cada ciclo durante las 8 horas de exposición que dura el experimento.

El patrón de ciclos hipóxicos llevados a cabo en el protocolo de HCl fue: Normoxia (20-21% de O₂) durante 80 segundos; Episodio hipóxico (10 ó 5% de O₂, PO₂≈ 80 ó 40 mm Hg) se alcanza en 22 segundos; restablecimiento de la situación de normoxia 18 segundos.

Este patrón de ciclos se repitió cada 2 minutos durante las 8 horas de sueño de los animales (8:00-16:00 horas). Una vez transcurrido ese tiempo, los animales fueron devueltos a sus jaulas originales y se mantuvieron en normoxia (aire ambiental, 21% de

O₂) durante las 16 horas restantes, hasta el día siguiente en el que volvían a introducirse en las cámaras de HI. La duración del protocolo experimental fue de 15 días.

3 Procedimientos quirúrgicos.

Las ratas fueron pesadas y posteriormente anestesiadas con pentobarbital sódico mediante inyección intraperitoneal (60 mg/Kg), excepto en la determinación de la presión arterial sistémica y los valores de gasometrías donde las ratas fueron anestesiadas con una mezcla de Ketamina (50 mg/Kg) y Valium (0.4 ml/Kg).

Para realizar la extracción de tejidos, se realiza una incisión longitudinal en el abdomen, se extraen los distintos tejidos: arteria renal (AR), cerebro, hígado y pulmón. Las AR son disecadas bajo lupa y mantenidos en una solución de Tyrode cirugía (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1.1 mM, Glucosa 5 mM, HEPES 10 Mm, pH=7.4) equilibrada con 100% de O₂ a 4°C, los tejidos cerebral, hepático y pulmonar son lavados con solución salina heparinizada (NaCl 0.9%), secados en papel de filtro humedecido, congelados en nitrógeno líquido y guardados en crio viales a -80°C hasta el momento de realización del ensayo (cerebro, hígado y pulmón), una vez extraídos los tejidos necesarios, los animales fueron sacrificados mediante sobredosis intracardiaca de pentobarbital.

4 Recogida de sangre y parámetros hematológicos.

Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción ventricular en los animales anestesiados y se recogieron sobre distintos anticoagulantes según el ensayo a realizar:

- EDTA-K2 para la determinación de la analítica completa en sangre total.
- Heparina para la determinación de la bioquímica general.
- Citrato sódico (ACS) para la determinación de catecolaminas en plasma.

Para conocer el estado general de los animales, se realizó una analítica completa llevada a cabo en el Hospital Clínico de Valladolid, con los equipos y métodos automatizados utilizados en los laboratorios de análisis clínico.

5 Medida de los niveles de gases, saturación de hemoglobina y valores de pH en sangre.

Un grupo independiente de ratas de 3-4 meses de edad, que previamente no habían sido expuestos a HCl, se utilizó para valorar los niveles de los distintos gases, saturación

de Hb y pH sanguíneos durante los distintos momentos que constituyen el ciclo hipóxico, en ambas condiciones de intensidad de HI (5 y 10%).

Los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con una mezcla de Ketamina (50 mg/Kg) y Valium (0.4 ml/Kg). Una vez el animal está anestesiado es canulado, mediante un catéter en la arteria carótida, para la extracción de muestras de sangre en distintos momentos del ciclo hipóxico. Se introduce un animal por cada cámara y se cierra herméticamente, dejando salir el catéter por la abertura de salida de gases para proceder a la extracción de sangre. Se inician los ciclos hipóxicos con la intensidad deseada (valores mínimos de PO₂ en cámaras del 10 ó 5% de O₂), se deja aclimatar al animal durante 30 minutos (15 ciclos hipóxicos) y se procede a la extracción de las muestras de sangre, en el momento previo de la caída de la PO₂ en la cámara (normoxia), en el momento justo después del mínimo de PO₂ en cámara (mínimo hipóxico) y en el momento de recuperación de la PO₂ en cámara al finalizar el ciclo hipóxico (normoxia). Las muestras anaeróbicas de sangre son analizadas de manera inmediata (Automatic Blood Gas System, ABL). Se realizaron distintas medidas en cada animal cada 20 minutos (10 ciclos hipóxicos) para valorar la respuesta en cada momento del ciclo a lo largo del tiempo.

6 Valoraciones del estado redox en tejidos.

Biomarcadores de daño oxidativo

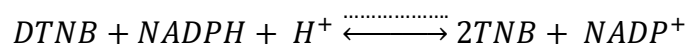
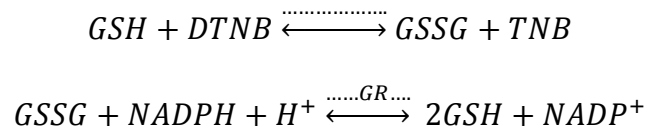
6.1 Valoración del Glutati3n reducido, Glutati3n oxidado y potencial redox E_{GSH}.

Los tejidos extraídos y conservados como se indica en la secci3n 3.3 son secados en papel de filtro y pesados. Se aña3de un volumen 5 veces el peso del tejido (w:v 1:5) de ácido sulfosalicílico 5% (ASS) y 0.25 mM de EDTA. Posteriormente el tejido se homogeniza en un homogeneizador OMNI-MIXER y se centrifuga (3x1000g, 5 minutos, 4°C), el sobrenadante es utilizado en la valoraci3n del glutati3n total (GSt) y oxidado (GSSG).

La valoraci3n del Glutati3n se realiza usando el m3todo de Griffith descrito en detalle en (Gonzalez et al., 2004), m3todo enzimático c3clico y colorim3trico, que se basa en la oxidaci3n del glutati3n reducido por el 5-5`-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) que se

transforma en el compuesto coloreado TNB (5-tio-nitrobenzoico)(máximo de absorción 412 nm.) y se acopla a la reducción cíclica del GSSG por la reacción enzimática catalizada por la glutatión reductasa(GR), utilizando como cofactor NADPH, de esta manera se consigue una amplificación y especificidad de la reacción.

Brevemente podemos esquematizarlo:



Siendo esta la reacción final

Este paso enzimático da especificidad y una alta sensibilidad (hasta 10^{-10} moles) al ensayo.

La concentración de los reactivos (DTNB, NADPH y GR) se eligió para obtener un incremento lineal de absorbancia durante 2 minutos. La pendiente de aparición de color (Δ absorbancia/ Δ tiempo) es proporcional a la concentración de glutatión en la muestra. Los ensayos realizados con diferentes concentraciones conocidas de GSH generaron una familia de líneas con diferentes pendientes. La representación de las pendientes de las líneas frente a la concentración de GSH es lineal y define una curva estándar que se utiliza para hallar por interpolación la concentración de glutatión total (GSt) presente en la muestra problema. Teniendo en cuenta que el GSt es la suma del reducido y el oxidado:

$$[GSt] = [GSH] + [GSSG]$$

Las muestras se realizan por duplicado, y la concentración de GSt total GSH y GSSG se expresan en $\mu\text{mol/g}$ tejido.

La determinación del GSSGs e realiza con un paso previo, las muestras son derivatizadas con 2-vinil piridina que se une al resto sulfhidrilo libre del GSH quedando de esta manera, únicamente, el GSSG que se encuentra en la muestra original. La derivatización se lleva a cabo de la siguiente manera: a 100 μl de sobrenadante del

homogenado se le añaden 2 µl de 2-vinil piridina. Posteriormente se ajusta el pH con 4 µl de trietanolamina (TEA) y se deja reaccionar 1 hora a temperatura ambiente.

El resto del ensayo se realiza de igual forma que para el glutatión total, excepto que utilizamos 20 µl de muestra y 4 UI de GR normalizando el volumen a 1 ml. Según el ciclo enzimático descrito con anterioridad por cada molécula de GSSG se forman 2 moléculas de GSH, de manera que al determinar el GSH total se evalúa: GSH + 0.5 GSSG.

La concentración de GSH se obtiene como diferencia del glutatión total menos el oxidado.

El potencial redox se calcula mediante la ecuación de Nernst mediante la siguiente fórmula:

$$E_{GSH} = -240 - 30,7 \times \text{Log} \frac{[GSH]^2}{[GSSG]}$$

6.2 Valoración de peróxidos lipídicos (LPO).

La reacción de ácidos grasos insaturados con los ROS principalmente con los radicales OH[•], produce peróxidos lipídicos inestables, los cuales se destruyen produciendo MDA y 4-HNE, ambos compuestos se miden para la valoración de los LPO.

Los tejidos utilizados se descongelan, se secan en papel de filtro y se pesan. Se añade un volumen 5 veces el peso del tejido (w:v, 1:5) de 20 mM Tris-HCl (pH=7.4). Por cada 1 ml de homogeneizado se añade 10 µl de hidroxitolueno butilado (0.1 M) en acetonitrilo, para prevenir la oxidación de la muestra. Posteriormente el tejido se homogeneiza en un homogeneizador OMNI-MIXER y se centrifuga (3x1000g, 10 minutos, 4°C), el sobrenadante se recoge y es utilizado en la valoración.

La valoración se realiza siguiendo las instrucciones del kit para determinar LPO (Bioxytech LPO-586; Oxis Health Products, Portland, OR, Estados Unidos), que tiene como ventaja que se desarrolla a temperatura de 45°C y otros aldehídos, diferentes al MDA y 4-HNE, no reaccionan con el cromógeno a esa baja temperatura.

Se recoge un pequeño volumen del homogenado para la posterior valoración de proteínas de la muestra mediante el método de Lowry.

Se toman 200 µl de sobrenadante de la muestra y se le añaden 650 µl de cromógeno (N-metil-2-fenilindol, 10.3 mM en acetonitrilo), agitando vigorosamente. Posteriormente se añaden 150 µl de ácido metanosulfónico 15.4 M, se agita y se incuba 40 minutos a 45°C. Posteriormente las muestras se introducen en hielo, y si es necesario debido a la aparición de precipitados, se centrifuga a 15000xg durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes se transfieren a una cubeta y se lee la intensidad de color a 586 nm. Se obtiene una curva patrón mediante diluciones sucesivas de una solución *stock* 10 mM de MDA y 4-HNE, en la cual el volumen del homogenado es sustituido por volumen de buffer y de estándar necesarios hasta llegar a 200 µl. Se prepara al mismo tiempo los blancos de las muestras, sustituyendo los 650 µl de cromógeno por el mismo volumen de una mezcla de 75% de acetonitrilo y 25% metanol. La absorbancia se interpola con la curva *standard*, expresándose los resultados como nmol/mg de proteína.

6.3 Valoración de las actividades de los enzimas aconitasa y fumarasa.

Se realiza la valoración de las actividades de ambos enzimas, siguiendo el método descrito por Couplan en (Couplan et al., 2002). Los tejidos hepático, cerebral y pulmonar se extraen, son pesados y se añade un volumen 10 veces el peso del tejido (w:v 1:10) en buffer de lisis (10 mM Tris-HCl, pH= 7.4, 250 mM sacarosa, 1 mM EDTA), se homogenizan con un homogeneizador OMNI-MIXER, se aísla la fracción mitocondrial, siguiendo el método descrito por Pecqueur en (Pecqueur et al., 2001). El pellet mitocondrial obtenido es resuspendido de nuevo en el buffer de lisis, y las mitocondrias son lisadas mediante la adición de Tritón X-100 a una concentración final de 0.5% peso/volumen. Se toman alícuotas de 10 a 40 µl de los lisados mitocondriales, según los distintos tejidos, para realizar el ensayo enzimático.

Las reacciones enzimáticas se realizan durante 8 minutos en el medio adecuado: 30 mM isocitrato sódico, 50 mM Tris-HCl, pH= 7.4, 0.6 mM MnCl₂ para el ensayo de la aconitasa y 50 mM de L-malato sódico, 50 mM Na₂HPO₄, pH= 7.4 para la fumarasa. El ensayo enzimático se realiza siguiendo el incremento de densidad óptica a 240 nm. El incremento lineal de la densidad óptica durante los últimos tres minutos, expresada como incremento minuto por mg proteína es tomado como la medida de la actividad enzimática. El cociente de la actividad aconitasa/fumarasa se expresa como el cociente

de los respectivos incrementos lineales de densidad óptica por minuto y por mg proteína.

Ensayos de enzimas eliminadores de ROS

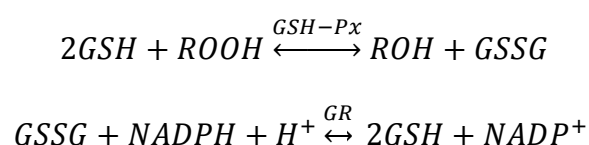
6.4 Valoración de la actividad de la enzima Glutati6n peroxidasa (GPx).

Los tejidos son descongelados, secados en papel de filtro y pesados. Se a1ade un volumen 5 veces el peso del tejido (w:v 1:5) de 20 mM Tris-HCl (pH=7.4). Posteriormente el tejido se homogeniza en un homogeneizador OMNI-MIXER y se centrifuga (3.5x1000g, 10 minutos, 4°C), el sobrenadante se recoge y es utilizado en la valoraci6n.

Se recogió un peque1o volumen del homogenado para la posterior valoraci6n de prote6nas de la muestra mediante el m6todo de Lowry. (Lowry 1951)

La valoraci6n de la actividad se realiza mediante el m6todo espectofotom6trico de Paglia y Valentine (Paglia & Valentine 1967), basado en la desaparici6n de la nicotinamida adenina dinucleotido fosfato en su forma reducida (NADPH), en una reacci6n acoplada. En un primer paso la enzima GPx oxida el GSH a GSSG en presencia de un per6xido, y en un segundo paso, el GSSG es de nuevo reducido a GSH por medio de la enzima glutati6n reductasa (GR) usando NADPH como donante de equivalentes de reducci6n.

La reacci6n esquem6ticamente se muestra a continuaci6n:



Previamente a la realizaci6n del ensayo se realizan las diluciones convenientes de las muestras problema. La mezcla de reacci6n final contiene 875 µl de buffer de trabajo (EDTA 1 mM, azida s6dica 1 mM, GSH 11 mM, NADPH 0.2 mM y 1 UI/ml de GR en el buffer de homogenizaci6n), de 5 a 20 µl de muestra (ajustada hasta 100 µl con buffer de homogenizaci6n). La mezcla se preincuba durante 4 minutos a 37°C, la reacci6n se inicia al a1adir el sustrato, 25 µl de soluci6n de Terc-butil hidrop6xido (diluci6n 1:100 en el buffer de homogenizaci6n).

Se monitoriza la disminución de la absorbancia a 340 nm y 37°C durante 1-2 minutos. Paralelamente se procede a la medición de los blancos que contienen todos los reactivos a excepción de la muestra de tejido.

La actividad de la GPx en la muestra (Δ absorbancia/min) se calcula en base al coeficiente de extinción molar del NADPH (6220 UA mol^{-1}) para expresado como UI / mg proteína (1 UI= $1 \mu\text{mol NADPH oxidado/ minuto}$).

6.5 Valoración de la actividad de la catalasa.

La valoración se realizó siguiendo una modificación del método de Aebi (Aebi 1984). Los tejidos se pesan y se añade un volumen 10 veces el peso del tejido (w:v, 1:10) de buffer fosfato 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 con una concentración 0.1%, pH=7. Se homogenizan con un homogeneizador OMNI-MIXER. Posteriormente se centrifugan ($10 \times 1000g$, 15 minutos, 4°C), los sobrenadantes se recogen en crio viales y se guardan a -80°C hasta la realización del ensayo. Se separa un pequeño volumen del homogenado para la posterior valoración de proteínas de la muestra mediante el método de Lowry.

La determinación se realiza en varias etapas:

Titulación del H_2O_2 . El H_2O_2 se degrada lenta y de forma espontánea, por lo que es necesario determinar correctamente antes de la realización del ensayo la concentración exacta de H_2O_2 que se utiliza, y debe realizarse la titulación del H_2O_2 que vaya a utilizarse. Utilizando H_2O_2 comercial con una concentración del 3%, se diluye 100 veces con buffer fosfato 50 mM, para estar en el rango de medida del espectrofotómetro, y se mide la absorbancia a 240 nm. Después mediante la ley de Lambert Beer se calcula la concentración real de H_2O_2 , siendo el coeficiente de extinción molar para el H_2O_2 a 240nm, $\epsilon_{mM} = 0.0436$.

Construcción de una recta patrón utilizando un *stock* de H_2O_2 10 mM previamente titulado, con valores comprendidos entre 0 y $0.075 \mu\text{moles/ml}$. Las diluciones necesarias para los distintos puntos de la recta patrón se realizaron con el buffer fosfato 50 mM pH=7, a $10 \mu\text{l}$ de cada dilución (correspondiente a cada punto de la recta patrón) se le añadió 1 ml de la solución cromógeno (buffer fosfato potásico 150 mM, pH 7, que contiene 4-antipirina 0,25 mM, ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibencenosulfónico 2 mM y $0,7 \text{ U ml}^{-1}$ deperoxidasa) se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y se lee la

absorbancia a 520 nm, se representan las absorbancias obtenidas frente a los μmoles de H_2O_2 .

Para realizar la valoración de las muestras se toman de 10 a 20 μl de las muestras diluidas convenientemente, completándose el volumen hasta 75 μl con el buffer fosfato 50 mM pH= 7. Seguidamente se añaden 25 μl de H_2O_2 200 mM dejándose reaccionar la muestra con el sustrato durante 1 minuto en un baño a 25°C. Pasado ese tiempo, se para la reacción añadiendo 900 μl de azida sódica 15 mM y se añade la solución de cromógeno de igual forma que para la realización de la recta patrón.

Simultáneamente a la valoración de las muestras es necesario efectuar un blanco, para ello se sustituye la muestra por un volumen equivalente de buffer, se añaden 75 μl de buffer fosfato 50 mM, pH=7, y 25 μl de H_2O_2 200 mM procediéndose de igual forma que para la muestra, estos blancos reflejan la máxima cantidad de H_2O_2 . La cantidad de H_2O_2 remanente en cada muestra debe de restarse a la que se encuentra en el blanco. El H_2O_2 encontrado en cada muestra es inversamente proporcional a la cantidad de catalasa presente.

La concentración de H_2O_2 que se encuentra en el blanco y las muestras después de su incubación y valoración con el cromógeno, se calcula por interpolación en la recta patrón.

La actividad enzimática de la catalasa se expresa en unidades internacionales (UI)/mg de proteína definida como ($\mu\text{mol}/\text{minuto}$)/mg de proteína, calculado de la siguiente forma:

A_0 absorbancia a 520 nm del blanco se corresponde a $[A_0]$ μmoles de H_2O_2 totales del blanco.

A_m absorbancia a 520 nm de las muestras se corresponde a $[A_m]$ μmoles de H_2O_2 no transformados en la muestra.

Los μmoles de H_2O_2 transformados por la catalasa en la muestra serán $[A_0]-[A_m]$.

$$\begin{aligned} \text{Actividad catalasa } \left(\frac{\mu\text{moles}}{\text{min} * \text{ml}} \right) &= \\ &= \frac{([A_0] - [A_m]) \mu\text{mol} * \text{dilución original} * 100}{(0,001 \text{ ó } 0,002\text{ml}) * \text{min}} \end{aligned}$$

Una unidad de catalasa se define como la cantidad de enzima que descompone 1 μmol de H_2O_2 por minuto a $\text{pH}=7$ y 25°C . Siendo la concentración inicial de sustrato 50 mM de H_2O_2 .

Posteriormente se realiza la corrección de la actividad de la catalasa teniendo en cuenta las proteínas totales determinadas utilizando el método de Lowry.

6.6 Valoración de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD).

Se extraen los tejidos hepático, pulmonar y cerebral, son pesados y añadido un volumen 10 veces el peso del tejido (w:v, 1:10) en buffer 0.25 sacarosa $\text{pH}=7.4$, 10 mM Tris y 1 mM EDTA, posteriormente homogenizados con un homogeneizador OMNI-MIXER. Los homogenados son centrifugados ($1.5 \times 1000\text{g}$, 5 minutos, 4°C) y el sobrenadante es recogido y guardado en crio viales a -80°C hasta la realización del ensayo de actividad de la SOD. Se separa un pequeño volumen del homogenado para la posterior valoración de proteínas de la muestra mediante el método de Lowry.

La actividad de la SOD se determina mediante un método indirecto, utilizando el kit de (Fluka/Sigma), que permite realizar medidas en placas de 96 pocillos. Para determinar la forma mitocondrial de la SOD (Mn SOD) se añade a la muestra cianuro potásico 3 mM que produce la inhibición de la forma citosólica de la SOD. La actividad de la isoforma citosólica (Cu-Zn SOD) se calcula restando la actividad de la SOD total de la actividad de la Mn SOD.

La valoración tanto de la SOD total como de la isoforma mitocondrial (Mn SOD) se basa en la utilización de la sal de tetrazolio altamente soluble en H_2O , WST-1(2-(4-Yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolio en forma de sal monosódica que al reaccionar con el $\text{O}_2^{\bullet-}$ produce un dieno-formazan que se puede medir espectrofotométricamente a 450 nm. El $\text{O}_2^{\bullet-}$ es producido previamente utilizando la reacción acoplada de la xantina oxidasa con el sustrato xantina, la actividad de la SOD en la muestra o en la curva patrón se valora por la desaparición enzimática del $\text{O}_2^{\bullet-}$. La velocidad de producción del $\text{O}_2^{\bullet-}$ está directamente relacionado con la actividad de la xantina oxidasa (XO) y la velocidad de desaparición del $\text{O}_2^{\bullet-}$ relacionada con la presencia de SOD que se encuentra en la muestra, de manera que es posible determinar la actividad enzimática de la SOD en función del % de inhibición de la formación del

formazan WST-1 o bien en base a las unidades enzimáticas de la SOD a través de la interpolación con una curva patrón.

Para calcular la actividad de la SOD se calcula el % de inhibición de la reacción de formación del dieno según la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = [(A_0B_1 - A_0B_3) - (A_0 \text{ muestra} - A_0B_2)] / (A_0B_1 - A_0B_3) \times 100.$$

$A_0 \text{ muestra}$ = absorbancia de la muestra (200 μ l WST + 20 μ l muestra + 20 μ l enzima).

A_0B_1 = absorbancia máxima que presenta el WST-1 presente en la reacción en ausencia de SOD (200 μ l WST + 20 μ l H₂O + 20 μ l de enzima).

A_0B_2 = absorbancia del blanco de la muestra (200 μ l WST + 20 μ l muestra + 20 μ l H₂O).

A_0B_3 = absorbancia del blanco (200 μ l WST + 20 μ l de H₂O + 20 μ l de buffer de dilución).

Posteriormente se calculan las unidades enzimáticas/mg de proteína (definiendo una unidad como la unidad de enzima que inhibe el 50% la reducción del citocromo c producida por el anión O₂^{•-} producido por la reacción de acoplamiento de la xantina-xantina oxidasa a 25 °C por minuto y pH 7.8).

6.6.1 *Determinación de la expresión de las enzimas catalasa y SOD-1 y SOD-2 (Western Blot).*

Western Blot.

La técnica de Western Blot o immunoblotting consiste en la detección y análisis de la expresión de diferentes proteínas. Nuestro objetivo fue el análisis de la expresión de la Catalasa, y de los dos isoenzimas de la SOD en tejido hepático.

Se homogeniza el tejido hepático en buffer de lisis (100 mg de tejido/300 μ l de buffer de lisis). La composición del buffer de lisis consistió: sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, Hepes 10 mM, pH= 7.5, con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma, Madrid, España). Se obtiene un sobrenadante inicial como fruto de una primera centrifugación a baja velocidad, para eliminar la fracción nuclear, que posteriormente es de nuevo centrifugado (1.6x1000 g, 45 minutos, 4°C), para obtener un nuevo sobrenadante que corresponde a la fracción citoplasmática para el ensayo de la catalasa y Cu,Zn-SOD (SOD citoplasmática). El pellet se resuspende en buffer de lisis (0-4°C)

conteniendo 1% SDS + 1mM de ditioneitol (DTT) y después de realizar frecuentes vortex durante 30 minutos, la muestra es centrifugada de nuevo (1.6x1000 g, 30 minutos a temperatura ambiental), el sobrenadante que corresponde a la fracción mitocondrial es utilizado para el ensayo de la isoforma mitocondrial de la SOD (Mn-SOD).

Las muestras con 50 µg de contenido en proteína, son electroforéticamente fraccionadas en un gel con una concentración 12% SDS-poliacrilamida, una vez finalizada la electroforesis (SDS-PAGE), las bandas de proteínas son transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF; Immobilon™-P, Millipore) por el método húmedo con un buffer de transferencia: Tris 250 mM, glicina 192 mM y 20% metanol (pH =8.3) en un Mini Trans-Blot (Mini Trans-Blot cell transfer, Bio-Rad, Hércules, CA, Estados Unidos). Las membranas se bloquean con 5% de leche desnatada en polvo diluida en TBS-T (buffer Tris salino 10 mM) e incubada toda la noche (buffer Tris salino 10 mM con 0.1% Tween 20 y 0.5% seroalbúmina bovina (BSA), 4°C) con anticuerpos primarios específicos: anti-Cu,Zn-SOD (antisuero de conejo; Millipore; 1:5000), anti-Mn-SOD (antisuero de conejo; Millipore; 0.5 µg/ml), anti-catalasa (antisuero de conejo; Novus Biologicals; 1:3000), y anti-β-actina (antisuero de ratón; Sigma; 1:5000) utilizando este último para normalizar las cargas en los pocillos. Por último, después de los lavados con TBS-T, las membranas se incuban con los correspondientes anticuerpos secundarios anti- Inmunoglobulina G (IgG), conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), anticuerpo de conejo IgG (Millipore; 1:20000) para la catalasa (anti-catalasa) y las dos isoformas de SOD (anti-Cu,Zn-SOD y anti-Mn-SOD), y anticuerpo de ratón IgG (BD Pharmingen; 1:1000) para la β-actina (anti-β-actina). Todos los anticuerpos fueron resuspendidos en TBS-T con 0.1% de BSA para bloquear las interacciones inespecíficas.

La detección de las bandas se realizó por quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciencias) y su cuantificación por densitometría utilizando la escala de grises (PDI system; Amersham) con posterior análisis de las manchas con el programa *Image J*.

Las densidades ópticas de las bandas correspondientes a tejidos experimentales se compararon con las de controles, que previamente han sido normalizados con la banda de β-actina en ambos casos. Se calcula la media de todos los replicados y se aplica el test estadístico para determinar si el cociente de las densidades de los tejidos experimentales y de los controles es estadísticamente diferente.

6.7 Análisis de la actividad del factor NF- κ B en hígado.

Se obtuvieron extractos nucleares siguiendo las instrucciones del kit de extracción nuclear (No. 40010; Active Motif, Rixensart, Belgica). Una vez obtenido los extractos nucleares se determina el contenido en proteínas por el método de Bradford (Bradford 1976). Las muestras de extractos nucleares conteniendo la misma concentración de proteínas se valoran siguiendo las instrucciones del kit (NF- κ B-p65 TransAM Transcription Factor Assay kit 40096; Active Motif). La activación se detecta mediante la incubación con el anticuerpo primario anti- NF- κ B, el cual reconoce específicamente el epítipo p65 accesible únicamente cuando el factor NF- κ B está activo y unido a ADN. Un anticuerpo secundario anti-IgG conjugado con peroxidasa de rabano (HRP) permite la detección espectrofotométrica del NF- κ B activo, a 450 nm.

6.8 Valoración de la proteína C reactiva (PCR) en plasma.

La valoración de la PCR se realizó mediante un *kit* para la determinación de la PCR en rata. La manipulación y metodología se realizo utilizando las instrucciones del *kit* (Cusabio Biotech, Bionova Cientifica, Madrid, España).

7 Medida de la presión arterial sistémica, y respuesta ante un estímulo hipóxico.

Tras los tratamientos previos los animales controles o sometidos previamente a HCl fueron anestesiados intraperitonealmente (ip) con una mezcla de Ketamina (50 mg/Kg) y Valium (0.4 ml/Kg), traqueotomizados, conectados a una bomba (CL Palmer, Londres, Reino Unido), y ventilados con una mezcla gaseosa de 20% aire 80% N₂. La frecuencia de ventilación fue de 40 ventilaciones por minuto, con presión espiratoria positiva de 2 cm de H₂O, el volumen tidal se ajustó a una presión inspiratoria máxima de 10 cm de H₂O iguales en todos los grupos.

La medida de presión arterial sistémica se realizó en la arteria carótida por medio de un catéter unido a un transductor de alta presión.

Una vez hallado los valores basales de presión arterial sistémica, se valoró la respuesta a un test de estimulación hipóxica.

Para ello se ventiló durante 2 minutos aproximadamente con una mezcla hipóxica (10% O₂), pasado ese tiempo se ventilo al animal con una mezcla gaseosa normóxica

(21% O₂) para que recuperara su estado basal, y de esta manera poder comprobar las hipotéticas variaciones de presiones ante un estímulo hipóxico.

Los transductores fueron calibrados con un manómetro de mercurio, y conectados a una tarjeta de adquisición de datos (Power Lab 16 SP, ADI Instruments, Castle Hill, Australia), desde donde fueron enviados a un ordenador para el almacenamiento y posterior análisis de los datos obtenidos.

Parámetros ventilatorios

8 Pletismografía.

Con la finalidad de analizar la función quimiorreceptora, se analizaron los parámetros ventilatorios de los animales, tanto jóvenes como viejos, mediante pletismografía de cuerpo entero (Emka Technologies, Paris, Francia; BUXCO Research Systems, Wilmington, NC, Estados Unidos). En ella los animales después de los 15 días del protocolo experimental de HCl, o control, son introducidos en cámaras de metacrilato de 5 litros de capacidad, con flujo de aire continuo de 2 litros/minuto gracias a un caudalímetro (Key Instruments) en situación de libertad de movimiento.

Los animales son colocados durante un periodo de unos 30 minutos antes del experimento, en condiciones de aire ambiental y de movimiento libre, para que se adaptaran al medio y permitiera la posterior obtención de parámetros ventilatorios en reposo. Continuamente se suministra aire fresco con un flujo de 2 litros/minuto. Una vez conseguido que el animal permaneciera en reposo se le somete al siguiente protocolo experimental:

Condición	Tiempo
21% O ₂	30 minutos (adaptación)
21% O ₂	20 minutos (lectura basal)
12% O ₂	10 minutos
21% O ₂	10 minutos
10% O ₂	10 minutos
21% O ₂	10 minutos
7% O ₂	10 minutos
21% O ₂	10 minutos
5% CO ₂ /21% O ₂	10 minutos
21% O ₂	15 minutos

La temperatura durante todo el experimento se mantiene dentro de un rango neutro (22-26°C), de igual manera la concentración de O₂ es continuamente monitorizada a través de una pequeña salida de las cámaras mediante un sensor de oxígeno (Sensor Oxyding, Dräger, Lübeck, Alemania).

Se mide la frecuencia respiratoria, el volumen corriente (volumen tidal) y el volumen minuto (ventilación total), seleccionando los periodos donde los animales ventilan de manera estable. La salida del flujo se dirige al espirómetro (EMKA Technologies) que envía la señal a una tarjeta de adquisición y análisis de datos, conectada a un ordenador (Buxco Fine Pointe Review; EMKA Technologies), donde los datos se monitorizan y almacenan para visualización y posterior análisis (Graph Pad Prism 4).

9 Medidas de la actividad del sistema nervioso simpático.

9.1 Niveles de catecolaminas en plasma

Se extrajo la sangre por medio de punción ventricular y se añadió a unos tubos previamente citratados y mantenidos en hielo. Posteriormente se realizó una primera centrifugación de 5 minutos (1x1000 g) descartando el pellet, para a continuación realizar una segunda centrifugación de 20 minutos (3x100 g) de la cual se recogió el sobrenadante al que se le añadió metabisulfito sódico (0.06g/ml) como conservante de CA, se congeló a -80 °C hasta el momento del análisis.

Previamente a la realización del análisis las muestras deben ser concentradas. Para ello se realiza un proceso de absorción en cartuchos Waters Oasis-HLB de 1 ml con lecho de 30 mg de polivinilbenceno-co-N-pirrolodina donde se adsorben las aminas, eluyéndose posteriormente al 100% con 500 µl de ácido cítrico 26.7 mM, pH= 2.9 y 2.5%MeOH (Raggi et al., 1999). Posteriormente una alícuota del eluato se inyecta en el sistema HPLC-EC para valorar el contenido de CA en el plasma.

El sistema HPLC-EC está formado por una bomba Milton Roy CM 400, una columna Waters C18 (4 µm), un inyector de Waters U6K, un detector electroquímico BAS LC-4A y un integrador Milton Roy C-1 4000.

Para la valoración de las CA plasmáticas se utilizaron estándares externos, inyectados en el sistema HPLC-EC previamente para su calibración (voltaje 0.65 v, sensibilidad 1 nA).

La fase móvil fue: 25 mM Na₂HPO₄ H₂O, pH=3.6 y 6% MeOH.

9.2 Valoración del contenido de catecolaminas en arteria renal.

Una vez el tejido ha sido disecado se introdujo en tubos eppendorf fríos (0-4°C) con un volumen de 300 µl de ácido perclórico (PCA) 0.1 N /EDTA 0.1 mM. Posteriormente los tejidos fueron pesados en una electrobalanza (Supermicro Sartorius Pacisa, Madrid) y fueron congelados a -80°C hasta el día del análisis.

El día que se realizó el análisis los tejidos fueron homogeneizados en frío (cristal/cristal) y centrifugados 5 minutos, 4°C (12x1000 g).

Del sobrenadante se tomó una alícuota de 25-50 µl que se inyectó en el sistema HPLC-EC, empleando una fase móvil 25 mM Na₂HPO₄, pH= 3.6, 6% MeOH.

La valoración del contenido de CA se realizó frente a estándares externos de concentraciones conocidas previamente inyectados en el sistema HPLC-EC.

9.3 Síntesis en arteria renal

Los depósitos de CA se marcan con su precursor natural 3-5-³[H]-tirosina (30µm, actividad específica 6 Ci/mmol; Perkin Elmer) y, los cofactores para tirosina hidroxilasa y DA-β-Hidroxilasa respectivamente 6-metiltetrahydro-biopterina (0.1 mM) y ácido ascórbico (1mM) durante 2 horas, la presencia de los cofactores optimiza el marcaje de los depósitos de CA (Fidone & Gonzalez 1982; Olea et al., 2014).

Posteriormente al marcaje, las AR se transfieren durante 5 minutos a viales con 10 ml de Tyrode cirugía libre de precursores a 0-4 °C para lavar la ³[H]-tirosina no incorporada, posteriormente las AR se pasan a viales con 100 µl de PCA 0.1N/EDTA 0.1 mM, se pesan en una electrobalanza (Supermicro, Sartorius, Pacisa, Madrid) y, se homogenizan a 0-4°C. Al homogenado se le añaden 40 µl de PCA 0.1 N/EDTA 0.1 mM para facilitar el lavado, se centrifuga 10 minutos, 4°C, 12x 1000 g y en los sobrenadantes se miden las cantidades de ³[H]-CA sintetizadas y ³[H]-tirosina. Posteriormente se inyectan 50 µl de tejido en el sistema HPLC-EC. La fase móvil utilizada es 25mM Na₂HPO₄, pH= 3.6 y 6% MeOH. La cuantificación de las ³[H]-CA sintetizadas y de la ³[H]-tirosina libre se realiza recolectando alícuotas de 1 ml de muestra a la salida del HPLC-EC y con posterioridad se cuentan en un contador de centelleo.

10 Métodos estadísticos.

Los datos se expresan como medias \pm error estándar de la media (media \pm SEM) de los valores obtenidos, la significación de la diferencia de las medias se estableció mediante el test de Student (t-test) para datos sin aparear en el caso de existir 2 grupos independientes. Se utilizó el análisis de la varianza tanto de una vía como de dos vías (One way y Two way ANOVA Student-Newman-keuls/Bonferroni Method) para la comparación de datos con más de dos variables. El estudio de las posibles diferencias significativas se realizó analizando el índice de significación p (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). Se consideran significativas aquellas diferencias con un valor de $p < 0.05$.

Resultados

Los resultados los estructuraré describiendo en primer lugar los referentes a los animales de experimentación jóvenes (3M) sometidos a dos intensidades de HCl 10 y 5% de O₂ y en segundo lugar los correspondientes a animales de experimentación de edad avanzada (24 M) sometidos a una única intensidad de HCl.

1 Comprobación previa de la metodología empleada

1.1 Datos gasométricos preliminares.

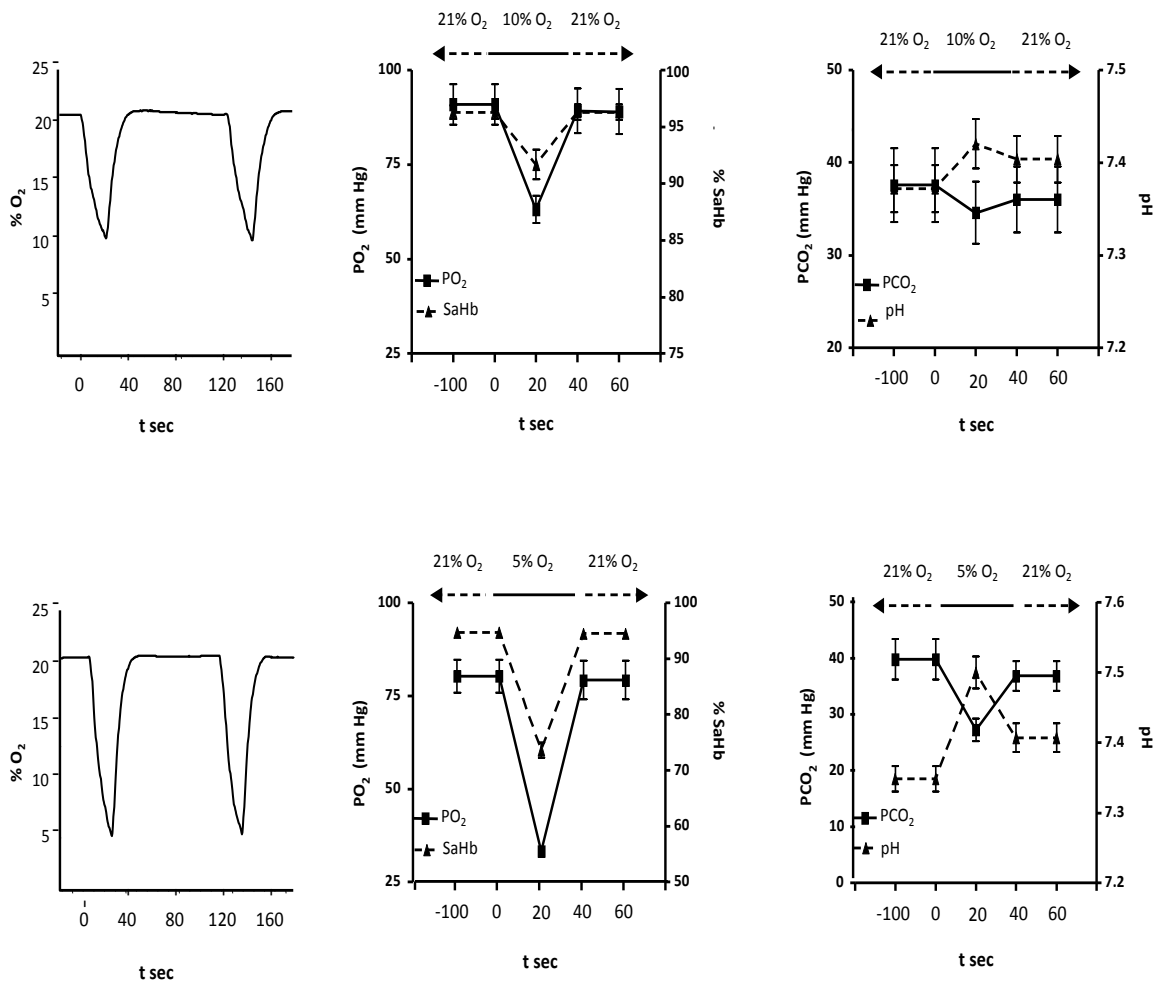


Figura 21: Valores gasométricos en el interior de la cámara de HCl. Presión parcial de gases en sangre arterial y saturación hemoglobina (HbO₂) (% SaHb), PCO₂ y pH en ciclos de hipoxia intermitente, con intensidades de 10 y 5% O₂.

En la figura 21 mostramos los valores gasométricos que se encuentran en el interior de las cámaras, en dos ciclos de HCl, como puede observarse la presión parcial de O₂ es cíclica, su valor inferior se corresponde con el deseado (5 o 10% de O₂), la recuperación a la normoxia es de 40 seg. Con este protocolo de HCl conseguimos obtener valores de saturación de HbO₂ mínimos (LSaO₂) de 74 y 92% respectivamente.

En la tabla II se muestran los valores de gases sanguíneos y saturación de hemoglobina medidos en varios ciclos de HCl, Los valores de PO₂ normóxicos previos a los episodios de hipoxia, oscilaron entre 80 y 95 mm de Hg en ambos protocolos experimentales, disminuyendo hasta 61.3 mm Hg (PO₂= 61.3 ± 2.5 mm de Hg, n= 8), en la intensidad de HCl del 10%, y 37.2 mm Hg (PO₂= 37.2 ± 0.9 mm de Hg, n=8) para el protocolo correspondiente al 5%. Recuperándose los valores normóxicos previos de PO₂ después de la exposición a los episodios hipóxicos.

Los valores arteriales de PCO₂ cayeron desde 37.6 ± 1.1 mm de Hg correspondientes a la normoxia previa, hasta 35.3 ± 3 mm de Hg en la intensidad del 10% y 25.3 ± 2.4 mm de Hg en el 5%. Los valores de PCO₂ post-hipóxicos se mantuvieron por debajo de los niveles basales, hasta recuperarse completamente antes de entrar en otro episodio de hipoxia.

El pH aumentó del nivel basal previo de 7.37 hasta 7.42 en la intensidad del 10%, y desde 7.34 hasta 7.5 en la correspondiente al 5%. Permaneciendo ligeramente aumentado, hasta la total recuperación de los valores basales, previo a otro ciclo de hipoxia. Las modificaciones de PCO₂ y pH se debieron a la hiperventilación refleja a la hipoxia.

El porcentaje de saturación de la hemoglobina antes de los ciclos de hipoxia fue 96.5 ± 0.75, cayendo hasta 94.9 ± 0.25 y valor mínimos de 91.7 ± 0.8 en la intensidad del 10% y 91.5 ± 0.2 y un mínimo de 73.5 ± 1.4 en el protocolo de HCl del 5%.

El porcentaje de tiempo total en el cual la saturación de hemoglobina fue inferior al 90%, fue 0 en la intensidad del 10%, alcanzando hasta el 25% en el protocolo de hipoxia del 5%. Existió correspondencia entre el número de episodios hipóxicos y el índice de desaturaciones de oxígeno en una hora, en ambos casos fue 30.

Tabla II: Valores gasométricos, saturación de hemoglobina y parámetros de severidad de HCl de intensidades de 10 y 5% en ratas jóvenes. Presión arterial de O₂(PaO₂), presión arterial de CO₂(PaCO₂), porcentaje de saturación de hemoglobina(ASaO₂), valor mínimo de saturación de hemoglobina(LSaO₂), tiempo total en el que la saturación de hemoglobina es inferior al 90% (T<90), índice de desaturaciones de O₂ en una hora(ODI), número de episodios hipóxicos en una hora (AHCl)

	Control	HCl 10% O ₂	Control	HCl 5% O ₂
PaO ₂	84.5±2.6	61.3±2.5	84.5±2.6	37.2±0.9
PaCO ₂	37.6±1.1	35.3 ± 3.0	37.6 ± 1.1	25.3 ± 2.4
ASaO ₂	96.5 ± 0.75	94.9 ± 0.25	96.5 ± 0.35	91.5 ± 0.2
LSaO ₂	-	91.7 ± 0.8	-	73.5 ± 1.4
T<90%	-	0	-	25
ODI (veces/h)	-	30	-	30
AHCl (veces/h)	-	30	-	30

2 Efecto de la HCl en ratas de 3 meses de edad con 2 niveles de intensidad (10 y 5% O₂)

2.1 Animales

Los animales toleraron bien ambas intensidades de hipoxia, no hubo ninguna pérdida de animales y la ganancia de peso en los sometidos al 10 % O₂ de HCl fue similar a la de los controles, sin embargo la ganancia de peso en los sometidos a HCl 5% O₂ fue inferior.

Fig 22 B

En la figura 22 A) se representa el aumento total de peso al inicio y al final del protocolo experimental. En todos los grupos hubo un aumento de peso, si bien en el grupo de HCl severa el aumento fue menos acentuado que en los grupos control y el de HCl moderada (HCl 10%). En B) se presenta el incremento de peso al final del tratamiento en los animales expuestos a los distintos niveles de hipoxia respecto a los controles. Se observa que aunque en todos los grupos existe un incremento del peso, el grupo expuesto a HCl severa (HCl 5%) tiene un incremento menor de lo esperado, apareciendo diferencias con respecto al grupo de HCl moderados (HCl 10%).

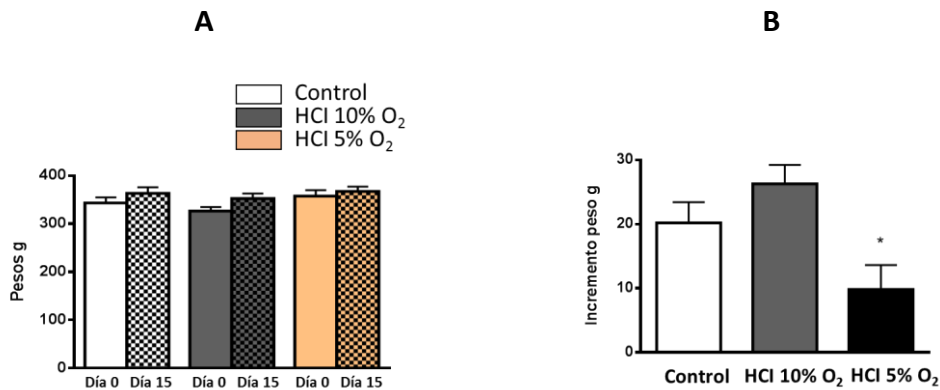


Figura 22: A) Aumento total de peso en animales jóvenes control e hipóxicos intermitentes del 10 y 5%. B) Incremento de peso en 15 días en animales jóvenes (3M) control e HCl sometidos a 10 y 5% O₂. Los datos se expresan valores medios \pm SEM. N= 8 a 10 animales. * $p < 0.05$.

Se extrajo el corazón para pesar el ventrículo derecho, el ventrículo izquierdo y el septo, para calcular el Índice de Fulton

$$\text{Índice Fulton} = \frac{\text{Peso ventrículo derecho}}{\text{Peso ventrículo izquierdo} + \text{peso septo}}$$

Los resultados obtenidos fueron en rata control $0,25 \pm 0,01$ y en animales sometidos a HCl $0,32 \pm 0,01$, no observándose ninguna diferencia significativa

2.2 Parámetros hematológicos y bioquímicos.

Para realizar una evaluación del estado general de los animales se valoraron diferentes parámetros hematológicos, entre los que se incluyen el recuento de eritrocitos, la concentración de Hb, el volumen corpuscular medio y el contenido de Hb corpuscular medio.

Como se observa en la tabla III, no existen diferencias significativas entre los animales controles y los animales expuestos a distintos niveles de intensidad de HCl, estos datos indican que la HCl en ratas no activa la eritropoyesis. A la vista de los datos hematológicos y junto a los datos antropométricos (variación de peso), se puede concluir, que en términos generales las ratas expuestas a ambos niveles de HCl, toleraron de forma satisfactoria las condiciones de ambos tratamientos.

Tabla III: Parámetros hematológicos y bioquímicos básicos de animales jóvenes control e HCl. Se presenta hematocrito, números de eritrocitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$), hemoglobina (g/100cc), volumen corpuscular medio (μm^3), contenido de hemoglobina corpuscular medio (pg) Glucemia mg/dl, Datos expresados como valores medios \pm SEM. N= 8 a 10 animales.

	Control	HCl 10% O ₂	Control	HCl 5% O ₂
Hematocrito %			45,74 \pm 1,8	46,06 \pm 1,0
Eritrocitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8,7 \pm 0,1	8,5 \pm 0,2	7.9 \pm 0.2	8.2 \pm 0.3
Hemoglobina (g/100 cc)	14,7 \pm 0,2	15,6 \pm 0 ,3	14.3 \pm 0.2	14.6 \pm 0.4
Volumen corpuscular medio (μm^3)	55,9 \pm 0,6	56,5 \pm 1,0	57.6 \pm 1.0	57.7 \pm 0.9
Contenido hemoglobina corpuscular medio (pg)	16,7 \pm 0,2	18,4 \pm 0,4	18,0 \pm 0.3	17.8 \pm 0.3
Glucemia (mg/dl)			75,9 \pm 1,1	77 \pm 4,1

2.3 Evaluación del daño oxidativo

2.3.1 Marcadores de daño oxidativo

2.3.1.1 Niveles de glutatión y potencial redox.

La tabla IV muestra los niveles de GSH, GSSG ($\mu\text{mol/g}$ de tejido), y el cociente GSH/GSSG en tejidos cerebral, hepático y pulmonar, en animales jóvenes expuestos a protocolos de HCl de 10 y 5% de intensidad de O₂. No encontramos en ningún caso diferencias significativas entre los animales control y los sometidos a HCl.

Se observa que los valores totales de glutatión tanto en cerebro como en pulmón oscilan entre 1.5 a 2 $\mu\text{mol/g}$ de tejido, mientras que en hígado los valores son 5 veces mayores. En los tres tejidos, el cociente GSH/GSSG es superior a 50, indicando que la mayor parte del glutatión se encuentra, en nuestras condiciones experimentales, en su forma reducida. El valor superior del cociente GSH/GSSG se encuentra en el tejido cerebral y el inferior en el pulmonar.

Tabla IV: Valores de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG), niveles de GSH/GSSG en tejidos cerebral, hepático y pulmonar en ratas control e HCl (10 y 5% O₂). Los datos son medias ± SEM, n= 10 a 20 animales control e HCl, **p < 0.01 HCl vs control.

PARÁMETRO	TEJIDO	GRUPO EXPERIMENTAL		
		CONTROL	HCl 10% O ₂	HCl 5% O ₂
GSH (μmol/g tejido)	Cerebro	1.6 ± 0.04	1.7 ± 0.04	1.6 ± 0.03
	Hígado	7.8 ± 0.2	7.4 ± 0.9	8.2 ± 0.3
	Pulmón	2 ± 0.04	2 ± 0.05	2.2 ± 0.06 **
GSSG (μmol/g tejido)	Cerebro	0.006 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.006 ± 0.001
	Hígado	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.01
	Pulmón	0.04 ± 0.003	0.04 ± 0.002	0.04 ± 0.004
[GSH]/[GSSG]	Cerebro	229 ± 34	208 ± 11	257 ± 20
	Hígado	100 ± 10	94 ± 10	91 ± 9
	Pulmón	58 ± 5	53 ± 4	64 ± 8

El cálculo del E_{GSH} refleja, el ambiente general redox celular, (Schafer et al., 2001). En la Fig. 23 se muestran los datos relativos al potencial de reducción del glutatión, calculado utilizando la ecuación de Nernst. Como puede observarse ninguna de las dos intensidades de HCl produjo una disminución permanente significativa de la capacidad amortiguadora redox de la célula. La variación que se observa en el tejido cerebral, en ambas intensidades de hipoxia, no es en ninguno de los casos significativo. Cabe señalar, por último, que el tejido pulmonar posee un potencial menos negativo que el cerebro y el hígado.

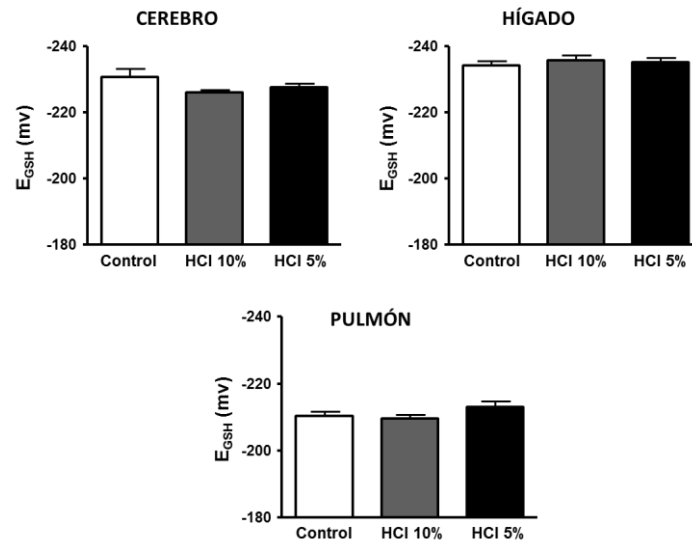


Figura 23. Potenciales redox de glutatión, E_{GSH} en hígado, cerebro y pulmón. En animales controles y expuestos a HCl de 10 y 5% O_2 . Datos expresados como medias \pm SEM, $n=20$ controles, 9 ó 10 HCl.

2.3.1.2 Niveles de lipoperóxidos (LPO) en tejidos.

Algunas especies de ROS (radical hidroxilo y perhidroxilo) pueden atacar los ácidos grasos insaturados de las membranas celulares, produciendo su peroxidación y fragmentación, liberando con ello LPO. La valoración de LPO se utiliza como indicador del daño oxidativo a la membrana celular. (Halliwell & Gutteridge 2007).

En la Fig. 24 se muestran los valores de LPO, valorados como malonaldehído y 4-HO nonenal, medidos en homogenados de hígado, pulmón y cerebro. Se observa que los valores, en pulmón de ratas control, casi doblan a los encontrados en los otros dos tejidos. La HCl aumenta la peroxidación lipídica en hígado de manera significativa y de forma paralela a la intensidad de hipoxia. En el tejido cerebral se observa un aumento de LPO solamente en el caso de HCl de intensidad severa, aunque este aumento no es significativo.

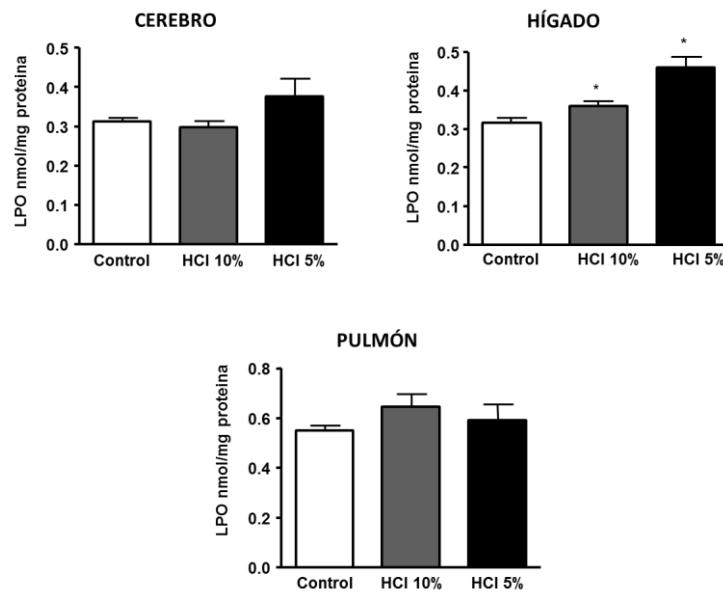


Figura 24: Niveles de LPO, expresados como nmol/mg prot., encontrados en cerebro, hígado y pulmón de ratas control e HCl del 10 y 5% de O₂. LPO corresponde a MDA y 4-HNE. Datos medias \pm SEM, n= 20 controles, 9 y 10 HCl. *P< 0.05 HCl vs control.

2.3.1.3 Actividades Aconitasa/Fumarasa.

La aconitasa es susceptible al daño oxidativo producido por los ROS, debido a que contiene un grupo prostético con estructura $[4Fe-4S]^{2+}$. El ataque oxidativo produce la liberación de Fe- α del centro activo, formándose $[3Fe-4S]^{1+}$. Esta nueva formación deja inactiva la enzima, incapaz de convertir el citrato en isocitrato (Bulteau et al., 2003). La enzima fumarasa (otro enzima del ciclo de Krebs) es resistente al ataque oxidativo, haciendo del cociente de las actividades de los enzimas aconitasa/fumarasa, medidos en la misma muestra de tejido, un efectivo índice del daño mitocondrial (Cantu et al., 2009).

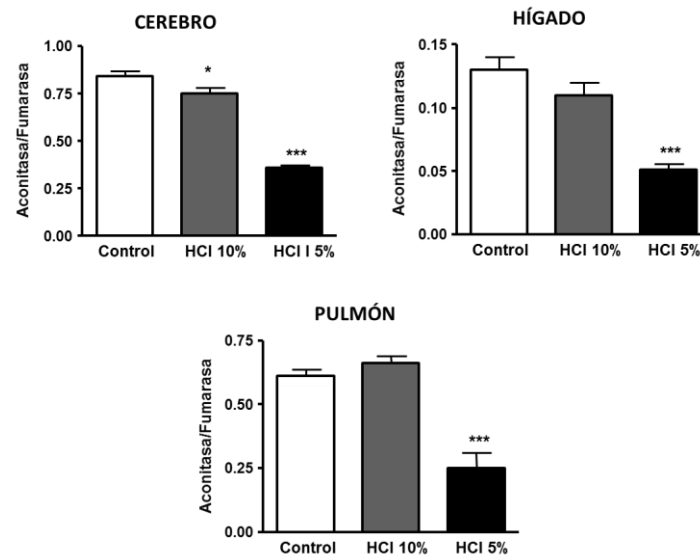


Figura 25 : Cociente de las actividades Aconitasa/Fumarasa, en homogenados mitocondriales de cerebro, hígado y pulmón de animales controles y expuestos a hipoxia de intensidades 10 y 5% O₂. Datos expresados como medias \pm SEM, n= 20 controles, 9 y 10 HCl. *P< 0.05, ***P<0.001 HCl vs Control.

En la Fig. 25 se muestran los cocientes de las actividades enzimáticas aconitasa/fumarasa medidos en homogenados de tejidos cerebral, hepático y pulmonar. En primer lugar observamos una diferencia en la razón de las actividades entre los tres tejidos estudiados. También observamos que la HCl del 5% O₂ causa una muy significativa disminución en la razón de las actividades aconitasa/fumarasa, en los tres tejidos estudiados, indicando esta disminución, un daño oxidativo a nivel mitocondrial. En la intensidad del 10% se observa una tendencia general hacia la disminución excepto en tejido pulmonar, apareciendo diferencias significativas en el tejido cerebral.

2.3.2 Actividades de enzimas eliminadores de daño oxidativo

2.3.2.1 Glutati3n peroxidasa GPx.

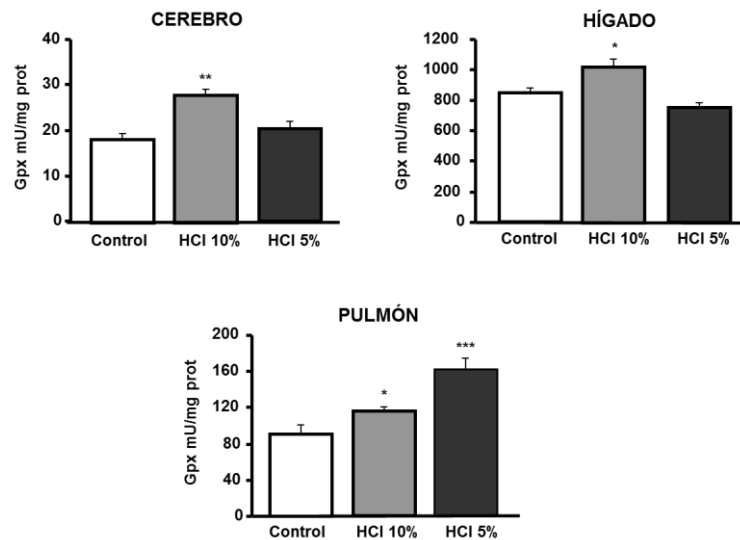


Figura 26 : Actividad de la enzima GPx, expresada como mU/ mg prot., en homogenados de cerebro, hígado y pulm3n de ratas controles e HCl 10 y 5% O₂. Datos presentados como medias \pm SEM, n= 20 controles, 9 y 10 HCl. *p< 0.05, **p< 0.01, ***p< 0.001 HCl vs control.

La principal funci3n de la GPx es reducir el H₂O₂ proveniente de la actividad de la SOD y la eliminaci3n de LPO. En la Fig 26 se muestran las actividades de GPx en homogenados de tejido cerebral, hepático y pulmonar. La actividad basal de la GPx en hígado es aproximadamente 10 veces mayor que en pulm3n y 40 veces mayor que en tejido cerebral. Se observa un aumento significativo de la actividad de la enzima con la intensidad de hipoxia de 10% O₂ en los tres tejidos. En el protocolo que utiliza la hipoxia severa (5%), solo se observa un aumento significativo en tejido pulmonar.

2.3.2.2 Catalasa.

La catalasa es junto a la GPx la enzima encargada de la eliminaci3n del H₂O₂. En la Fig. 27 se muestran las actividades de la enzima catalasa en homogenados de cerebro, hígado y pulm3n, así como su expresi3n en tejido hepático. La actividad basal de la catalasa en hígado es aproximadamente 15 veces mayor que en pulm3n y 100 veces mayor que en tejido cerebral.

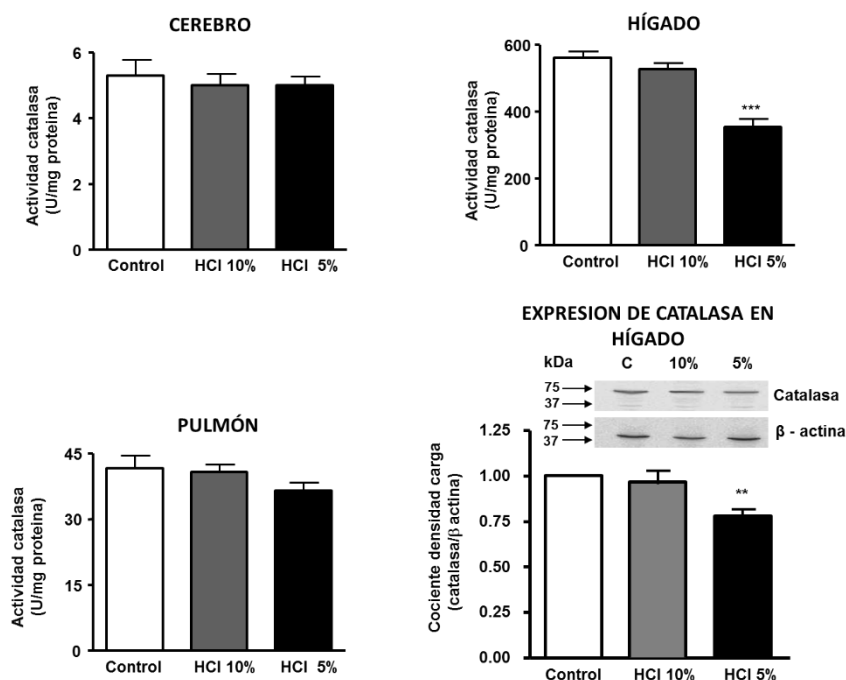


Figura 27: Actividad de la catalasa, expresada como U/mg prot., en homogenados de cerebro, pulmón e hígado, expresión en hígado, de animales control e HCl de 10 y 5% de intensidad de O_2 . Datos son medias \pm SEM, $n = 24$ controles, 14 HCl. *** $P < 0.001$ HCl vs control. Expresión de la catalasa en hígado de animales control y animales expuestos a intensidades de hipoxia de 10 y 5%, expresado como cociente de la densidad de la catalasa respecto a bandas de β -actina. Datos presentados como medias \pm SEM, $n = 7$ en todos los grupos. ** $p < 0.01$ HCl vs control.

La HCl severa (5%), produce una disminución significativa de la actividad de la catalasa en tejido hepático, no observándose variaciones significativas, en los otros tejidos, a ninguna de las intensidades de hipoxia

Los datos de la expresión de la catalasa en hígado, también muestran una disminución significativa, en la hipoxia de intensidad del 5%, con un descenso en la expresión de la enzima, de una magnitud comparable al observado en la actividad, implicando esto que la enzima expresada presenta una actividad normal.

2.3.2.3 Superóxido dismutasa (SOD).

En la Fig. 28 se muestran las actividades de la Mn-SOD y CuZn-SOD en homogenados de tejido cerebral, hepático y pulmonar, así como la expresión en hígado de ambas enzimas.

Se observa que la mayor actividad dismutadora está en la forma citosólica (CuZn-SOD) (Kinnula et al., 2003). La actividad de la SOD es alrededor de diez veces mayor en tejido hepático que en los tejidos pulmonares y cerebrales que presentan actividades similares. En hígado encontramos una disminución significativa en la actividad de ambas

isoformas, con las dos intensidades de Hipoxia, en pulmón, ambas isoformas disminuyen pero solo aparecen diferencias significativas en la isoforma citoplasmática con la intensidad del 10%. En cerebro la actividad de la Mn-SOD disminuye en la intensidad más severa (5% de O₂), mientras que la CuZn-SOD disminuye con la intensidad del 10%.

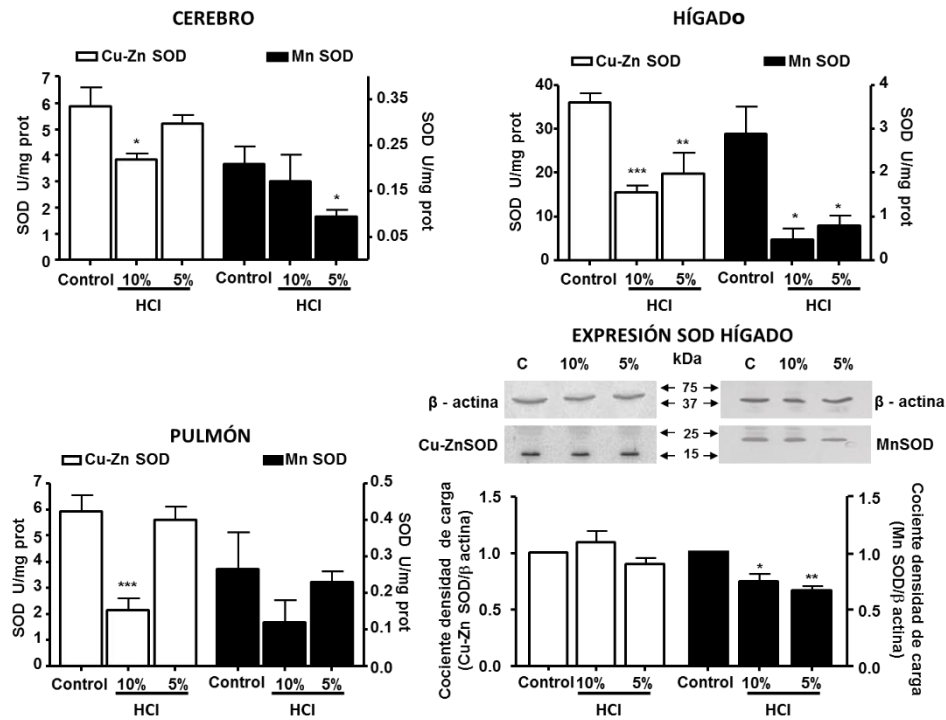


Figura 28: Actividades de la SOD mitocondrial (Mn-SOD) y citosólica (Cu-Zn-SOD) en homogenados de hígado, pulmón y cerebro de animales control e HCl de intensidades 10 y 5% O₂. Expresión de ambas isoenzimas en hígado de controles e HCl de 10 y 5% de O₂ expresado como cociente de la densidad de carga de la SOD respecto a β -actina. Datos son medias \pm SEM, N= 7 control e HCl. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ HCl vs control.

En la Fig.28 mostramos cómo la expresión de CuZn-SOD en hígado no fue afectada de forma significativa por ninguna de las dos intensidades de Hipoxia, mientras que el nivel de expresión de Mn-SOD disminuyó de manera significativa en ambas intensidades de Hipoxia intermitente, sin embargo la disminución de la expresión de la Mn-SOD fue menor que la disminución en su actividad, indicando que la HCl disminuye la actividad de la enzima expresada.

2.3.3 Activación del factor NF- κ B en hígado.

El NF- κ B es un factor de transcripción con una amplia diversidad de funciones celulares entre ellas la regulación de la expresión de citoquinas inflamatorias. Los ROS pueden actuar como segundos mensajeros influyendo en la activación de NF- κ B, por ello tratamos de estudiar su actividad en hígado, el tejido estudiado con un mayor estrés

oxidativo y que juega un papel clave en los desórdenes que presentan los pacientes con AOS y exhiben niveles mas altos de activación NF- κ B.

En la figura 29 se observa un aumento significativo en la actividad del factor NF- κ B relacionado directamente con la intensidad de HCl a la que cada grupo ha sido expuesto

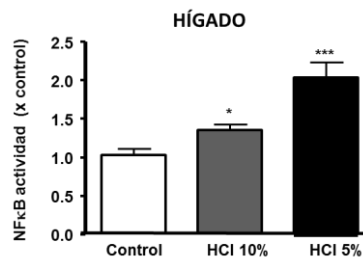


Figura 29: Actividad del factor nuclear NF- κ B en hígado en ratas jóvenes control e hipóxicos intermitentes del 10 y 5% de intensidad de O₂. Datos son medias \pm SEM, n= 18 controles, 9 HCl encada grupo. * $<$ p 0.05, *** $<$ p 0.001 HCl vs control.

2.3.4 Niveles de proteína C reactiva (PCR) en plasma.

La proteína C reactiva es un reactante de fase aguda sintetizado principalmente en los hepatocitos como respuesta a mediadores inflamatorios y liberado al plasma. La unión de la PCR a las células puede desencadenar la producción de ROS, creando un círculo vicioso que produce inflamación crónica.

En la Fig 30 se presentan los valores de PCR en plasma, observándose un aumento significativo de los niveles plasmáticos de PCR de manera dependiente a la intensidad de la HCl administrada.

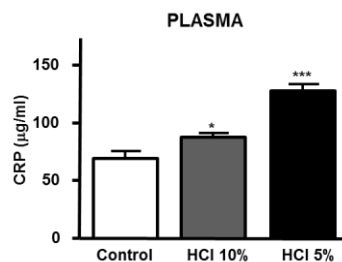


Figura 30: Niveles plasmáticos de proteína C reactiva en ratas control e HCl del 10 y 5% O₂. Datos son medias \pm SEM, n= 18 controles, 9 HCl encada grupo. * $<$ p 0.05, *** $<$ p 0.001 HCl vs control.

2.4 Parámetros ventilatorios.

Los datos anteriores nos indican que con las dos intensidades de HCl 10 y 5% de O₂, los animales se encuentran sometidos a un estrés oxidativo, que este es claramente más intenso en la HCl severa, por lo que el estudio de la respuesta ventilatoria, se valoró solamente en los sometidos a HCl 5% O₂

La respuesta ventilatoria de animales jóvenes controles (3M) y expuestos a HCl de intensidad del 5% (3MHCl), se evaluó mediante pletismografía de cuerpo entero, en atmosferas que contenían 21 (aire), 12, 10 y 7 % de O₂ balanceado con N₂, y aire con 5 % CO₂.

La Fig 31 A) y B) Muestra: la frecuencia respiratoria y el volumen corriente, en las condiciones atmosféricas anteriormente descritas. En los animales sometidos a HCl la frecuencia respiratoria y el volumen corriente tiende a disminuir alrededor de un 10% en todas las intensidades probadas. El valor máximo del volumen corriente se presenta en la atmosfera de 7% de O₂ tanto en el grupo control como en el HCl.

En la Fig 31 C) Se muestra la respuesta ventilatoria como volumen minuto (VM), en todas las condiciones experimentales, tanto en animales control como los sometidos a HCl, se observa un aumento, obteniéndose el máximo aumento en la condición de Hipoxia del 7%. Dado que la frecuencia y el volumen corriente tienden a disminuir en todas las atmosferas probadas, en animales sometidos a HCl, el volumen minuto disminuye de forma significativa. La exposición a HCl causa una disminución significativa de la ventilación, en torno al 20%, en todas las atmosferas probadas con un p<0,05, excepto en aire atmosférico.

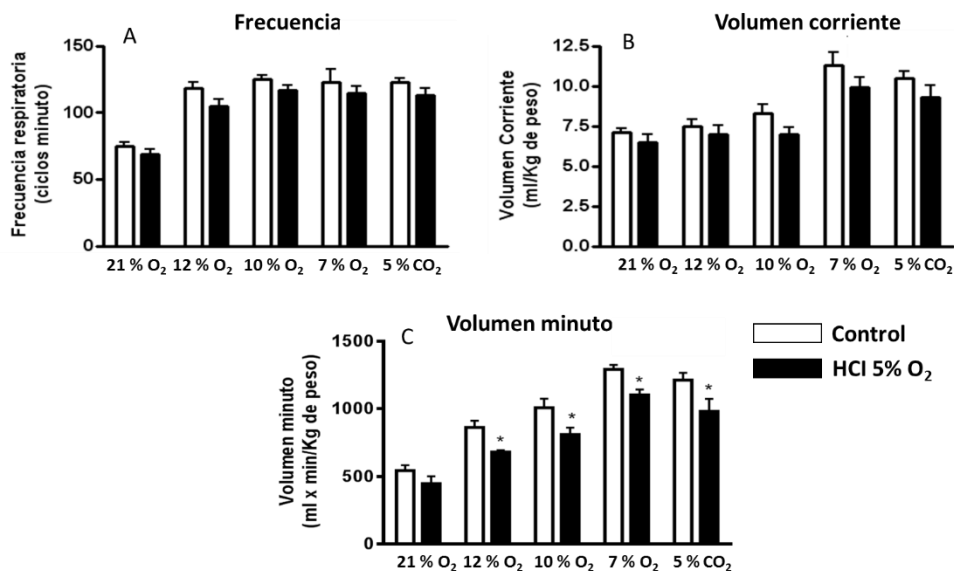


Figura 31: A) Frecuencia, B) volumen corriente y C) volumen minuto en ratas jóvenes control e HCl de 5% intensidad de O₂. Expuestas a atmósfera control (21% O₂), hipóxicas (12%, 10% y 7% O₂) e hipercápnica (5% CO₂). Datos son medias \pm SEM, n=8. *p< 0.05 HCl vs control.

2.5 Actividad del SNS

2.5.1 Niveles de catecolaminas en plasma y síntesis y contenido en arteria renal.

Estos tres parámetros se estudian como índice de la actividad simpática.

Niveles de catecolaminas en plasma.

En la Fig. 32 se presentan los niveles Epinefrina (E), Norepinefrina (NE) y Dopamina (DA), en plasma de ratas jóvenes control e HCl.

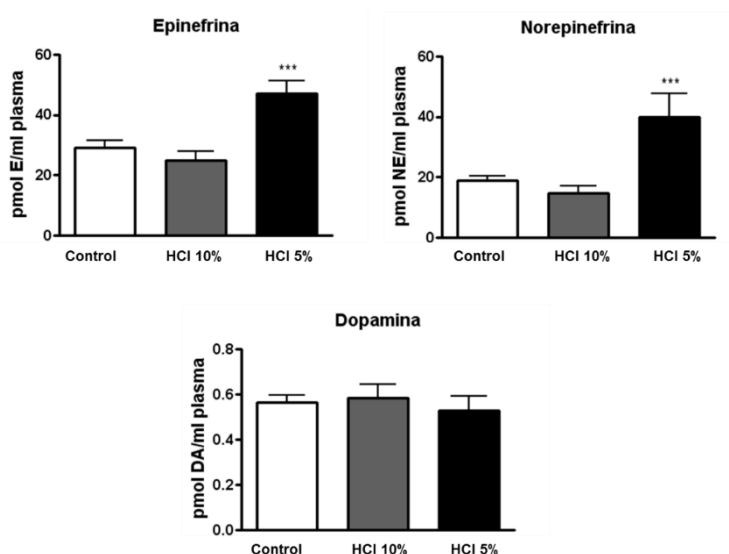


Figura 32: Contenido de Norepinefrina (NE), Epinefrina (E) y Dopamina (DA) en plasma de animales jóvenes controles e HCl del 10 y 5% O₂. Datos son medias \pm SEM, n= 10 a 16 animales. ***p< 0.001 HCl vs control.

Se observa un aumento significativo tanto en la concentración de Epinefrina como en la de Norepinefrina en el grupo de HCl del 5%, sin embargo la concentración de Dopamina no varía en ninguno de los dos protocolos experimentales estudiados.

Síntesis y contenido de Norepinefrina en Arteria Renal.

En la Fig 33 A) se presentan los datos de síntesis y en B) el contenido de Norepinefrina (NE) en AR, como indicadores de actividad simpática a nivel de las fibras terminales del SNS.

La síntesis de NE solamente se estudió en animales sometido a HCl de intensidad 5% de O₂. Como puede verse en la Fig. 33 A) la HCl causó un aumento significativo. En la Fig. 33 B) vemos un aumento significativo en el contenido en NE en los animales sometidos a las dos intensidades de HCl (10 y 5% O₂).

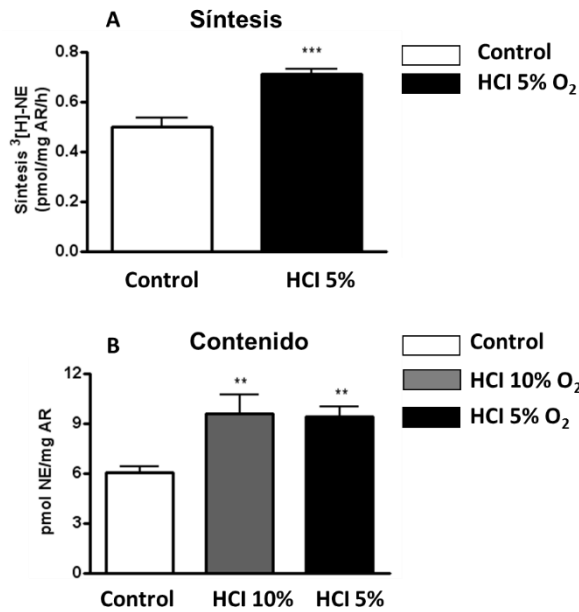


Figura 33: A) Síntesis de Norepinefrina (NE) en AR. La síntesis fue medida como ³[H]-NE, en animales control e HCl de intensidad del 5% O₂. B) Contenido de Norepinefrina (NE) en arteria renal valorados en ratas control y sometidas a HCl de intensidad 10 y 5% O₂. Datos son medias ± SEM, n=16 a 21 individuos. ***p<0.001, **p<0.01 control vs HCl.

2.5.2 Efectos de HCl sobre la presión arterial sistémica.

La presión arterial es el parámetro cardio-circulatorio, más común y más sencillo, utilizado para establecer los efectos de la HCl (Fletcher et al., 1992). En la Fig. 34 se muestra la presión arterial sistémica en animales jóvenes 3M, 3M HCl 10% y 3M HCl 5% y la variación de la presión arterial sistémica al someterlos a un test de Hipoxia aguda del 10% de O₂ de tres minutos de duración y la posterior recuperación.

En primer lugar se observa un incremento de la presión arterial sistémica basal, directamente relacionado con la severidad de la HCl, apreciándose diferencias significativas en la Hipoxia de intensidad del 5%. Los valores de presión arterial encontrados fueron: en animales control 100 mmHg, en 3M HCl 10% O₂ 120 mmHg y en 3M HCl 5% O₂ 150 mmHg. La presión disminuye a casi la mitad, en los tres grupos, tras tres minutos de exposición a Hipoxia aguda del 10% de O₂, volviendo a aumentar hasta niveles próximos a los basales después de la exposición a la Hipoxia aguda, apareciendo de nuevo diferencias significativas en los animales HCl de intensidad del 5% respecto al grupo control.

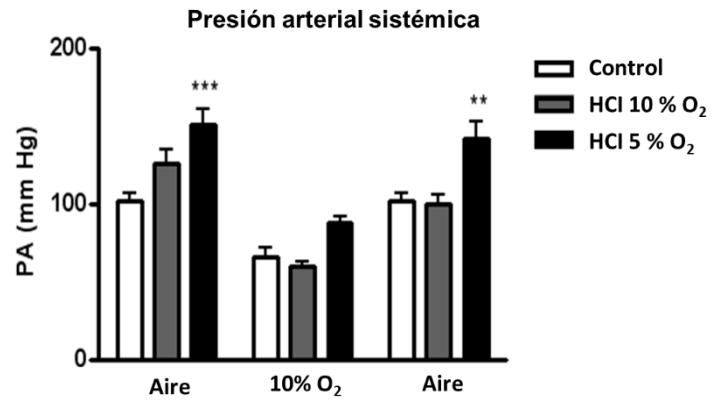


Figura 34: Presión arterial sistémica basal, después de 3 minutos de exposición a Hipoxia aguda del 10% de O₂, y tras la recuperación, en ratas control e HCl de 10 y 5% de O₂. Datos son medias \pm SEM, n= 8 a 14. ***p< 0.001, **p< 0.01 HCl vs control.

Con los resultados expuestos anteriormente, hemos puesto en evidencia, que la HCl, en ratas de 3 meses de edad, produce en menor o mayor grado, daño oxidativo, modificaciones en los parámetros ventilatorios, aumento en la concentración plasmática de CA, aumento en la secreción y contenido de NE en AR y por último una elevación muy significativa en la presión arterial sistémica. Estas alteraciones son muy notorias utilizando la intensidad de HCl de 5% O₂. Uno de nuestros objetivos es estudiar el efecto de la HCl en ratas de edad avanzada, 24M, para ello utilizaremos los mismos criterios de evaluación del daño y dado que las mayores modificaciones las hemos detectado con la HCl de intensidad 5% de O₂, será esta la única intensidad de hipoxia a la que serán sometidas estas ratas 24M.

3 Efecto de la HCl en ratas de 24 meses de edad (24M).

3.1 Animales

Los animales toleraron bien la intensidad de Hipoxia del 5% de O₂, no hubo ninguna pérdida de animales y la ganancia de peso fue similar a la de los controles.

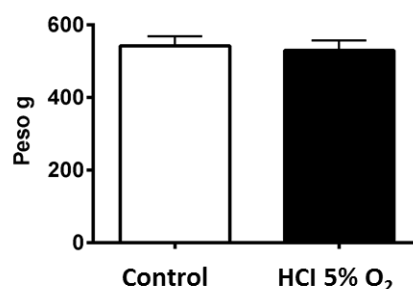


Figura 35: Peso en ratas de 24 meses de edad (viejas), controles e HCl del 5% O₂. Datos son medias ± SEM, n= 8 controles e HCl.

En la Fig. 35 se representa el peso de ratas de 24 M (viejas), al final del tratamiento, no observándose diferencias significativas entre individuos control e HCl de intensidad del 5%.

Se extrajo el corazón para pesar el ventrículo derecho, el ventrículo izquierdo y el septo, para calcular el Índice de Fulton, obteniendo los valores siguientes: rata 24M, 0,24±0,005 y en ratas 24MHCl 0,23±0,01, no observándose ninguna diferencia significativa.

En la tabla V se muestran los valores del hematocrito observándose, en los animales sometidos a HCl, un ligero aumento que no llega a ser significativo. Como parámetros

bioquímicos se valoraron la glucemia y las enzimas GOT y GPT, no observando ninguna diferencia significativa

Tabla V: Se presenta hematocrito, Glucemia mg/dl, GOT (UI) y GPT (UI). Datos expresados como valores medios \pm SEM. N= 8 a 10 animales.

	Control	HCl 5% O ₂
Hematocrito %	42,2 \pm 1,1	47,4 \pm 3,2
Glucemia (mg/dl)	76 \pm 2,7	81 \pm 3,6
GOT (UI)	32,64 \pm 2,3	32,66 \pm 2,1
GPT (UI)	19,81 \pm 1,6	20,71 \pm 0,89

3.2 Evaluación del daño oxidativo

3.2.1 Marcadores de daño oxidativo

3.2.1.1 Niveles de glutatión y potencial redox en ratas 24 meses de edad.

La tabla V muestra los niveles de GSH, GSSG, y el cociente GSH/GSSG en tejidos pulmonar, hepático y cerebral, en animales de 24 meses, expuestos a protocolos de HCl de 5% de intensidad. Igual que en los animales 3M todos los tejidos tienen concentraciones de GSH en el rango mM siendo el tejido hepático el que presenta el valor más alto, aproximándose a 10 mM. La razón más elevada de GSH/GSSG se encuentra en el tejido cerebral y la más baja en el tejido pulmonar. Sin embargo, en animales 24M, en hígado y pulmón la razón GSH/GSSG es significativamente menor que en ratas 3M, y en pulmón el valor del E_{GSH} es menos negativo (-198.0 \pm 3.0 vs. -213.0 \pm 2.7 mv; +++p<0.001). Igual que en las ratas 3M, la HCl no causó ninguna modificación en ninguno de los parámetros relativos al glutatión

Los valores totales de glutatión, tanto en cerebro como en pulmón oscilan entre 1.5 a 2 μ mol/g de tejido, en hígado los valores aumentan hasta casi 5 veces, similar a lo observado en ratas jóvenes. En pulmón se observa un aumento significativo del glutatión reducido (GSH), posiblemente para paliar el daño debido a la exposición directa de gases provenientes del medio externo.

El cociente GSH/GSSG muestra valores comprendidos entre 27 (tejido pulmonar) hasta 250 (tejido cerebral), indicando que la mayor parte del glutatión encontrado aparece en su forma reducida, esto mismo sucede en ratas 3M. El cerebro presentó el cociente GSH/GSSG más elevado mientras que el tejido pulmonar fue el que presentó el cociente más bajo.

*Tabla VI: Valores de glutatión reducido (GSH), oxidado (GSSG), niveles de GSH/GSSG en tejidos cerebral, hepático y pulmonar en ratas viejas controles e HCl (5% O₂). Los datos son medias ± SEM, n= 8 controles e HCl, *p < 0.05 control vs HCl.*

PARÁMETRO	TEJIDO	GRUPO EXPERIMENTAL	
		CONTROL	HCl 5% O ₂
GSH (μmol/g tejido)	Cerebro	1.65 ± 0.25	1.79 ± 0.18
	Hígado	7.9 ± 0.93	8.05 ± 1.7
	Pulmón	1.61 ± 0.15	1.83 ± 0.08 *
GSSG (μmol/g tejido)	Cerebro	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001
	Hígado	0.12 ± 0.04	0.12 ± 0.03
	Pulmón	0.06 ± 0.007	0.06 ± 0.001
[GSH]/[GSSG]	Cerebro	259 ± 17	253 ± 8.5
	Hígado	74 ± 7	68 ± 7.6
	Pulmón	27.3 ± 2.2	32.7 ± 2.5

En la Fig. 36 se presentan los valores de E_{GSH} en homogenados de tejido pulmonar, hepático y cerebral. No observándose diferencias significativas entre grupos control e HCl en ninguno de los tres tejidos.

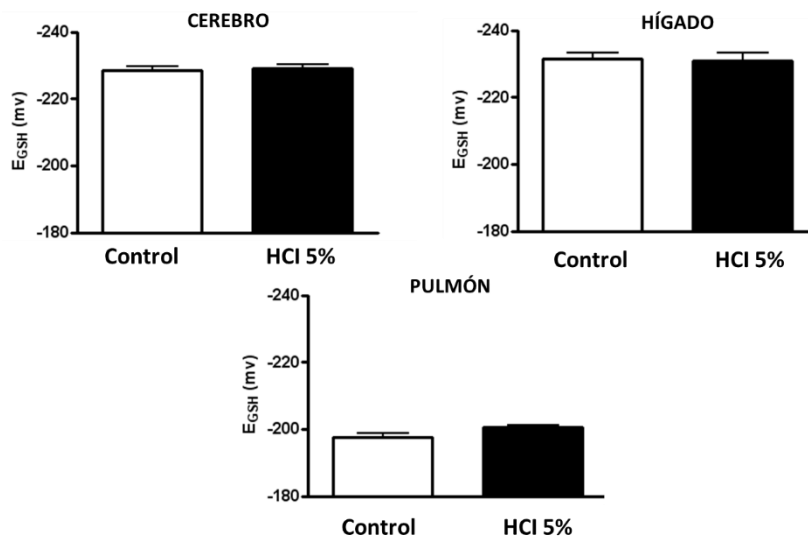


Figura 36: Potenciales redox de glutatión E_{GSH} , en hígado, cerebro y pulmón. En animales viejos controles e HCl de intensidad del 5% O_2 . Datos expresados como medias \pm SEM, $n=8$.

3.2.1.2 Niveles de LPO en tejidos.

En la Fig. 37 se muestran los valores de LPO (medidos como MDA y 4-HNE) expresados como nmol/mg de proteína.

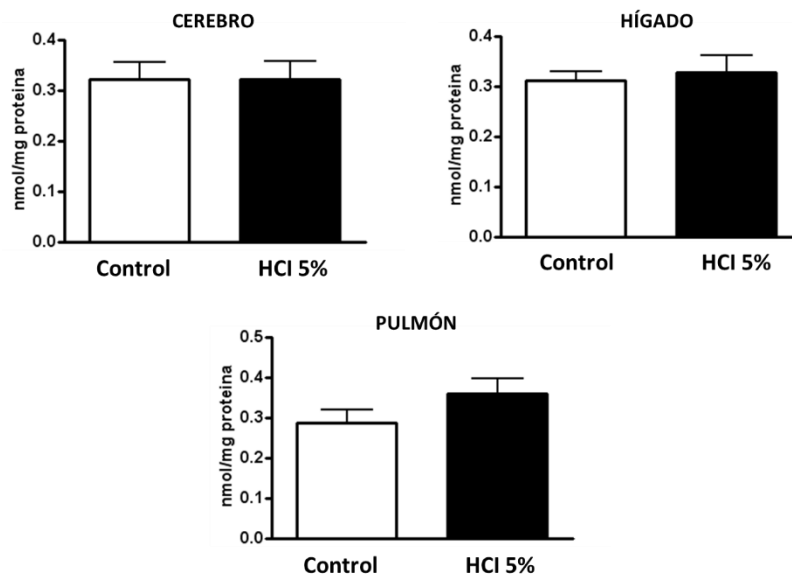


Figura 37: Niveles de LPO, expresados como nmol/mg prot., en homogenados de cerebro, hígado y pulmón de ratas viejas control e HCl 5% O_2 . LPO corresponde a valoración de malonaldehído y 4-hidroxialquénales. Datos medias \pm SEM, $n=8$.

Los valores encontrados son similares en los tres tejidos estudiados ($\approx 0,3$ nmol/mg prot). Estos valores son también similares a los encontrados en 3M, excepto, y sorprendentemente, en el tejido pulmonar que son mucho menores. La HCl no alteró

los valores de LPO, no apreciándose diferencias significativas en ninguno de los tejidos, existiendo un mayor aumento en el tejido pulmonar de los animales sometidos a HCl intensidad 5% O₂, sin llegar a ser significativo.

3.2.1.3 Actividades Aconitasa/Fumarasa.

El cociente de las actividades de los enzimas aconitasa y fumarasa se utiliza como índice de daño oxidativo a nivel mitocondrial. La actividad de la aconitasa tiende a disminuir con la edad, esto no ocurre con la actividad fumarasa (Yan et al., 1997), como consecuencia el cociente general entre las dos enzimas disminuye. En la Fig. 38 se muestran los cocientes de las actividades de los 2 enzimas. La razón, es prácticamente similar a la que encontramos en ratas 3M excepto en el tejido pulmonar que es mucho menor 0.58 ± 0.04 y 0.26 ± 0.15 en 3M y 24M respectivamente. La HCl, al contrario de lo que ocurre en 3M, no causa ninguna disminución en la razón de las actividades enzimáticas en ninguno de los tejidos estudiados.

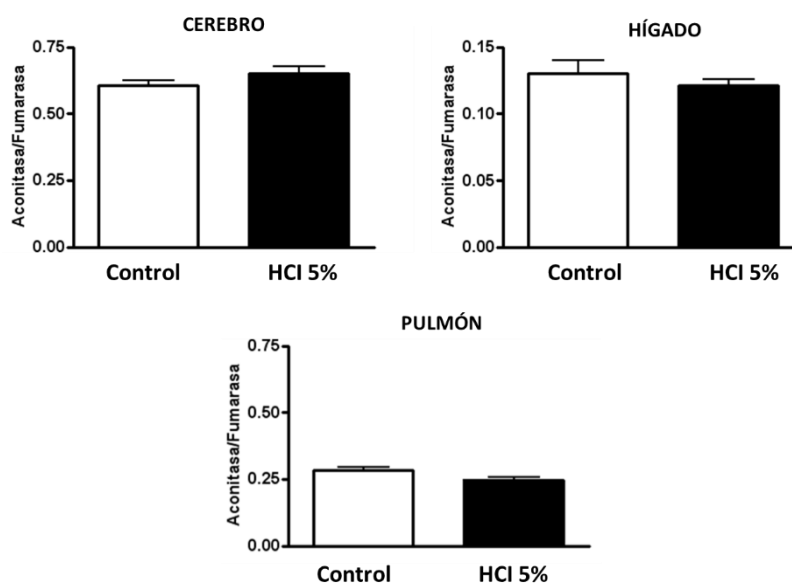


Figura 38: Cociente de las actividades de Aconitasa/Fumarasa, en homogenados mitocondriales de cerebro, hígado y pulmón de animales viejos, controles y expuestos a HCl del 5% de O₂. Datos expresados como medias \pm SEM, n= 8.

3.2.2 Enzimas eliminadores de ROS

3.2.2.1 Glutación peroxidasa GPx

En la Fig 39 se muestran las actividades enzimáticas de la glutación peroxidasa. La actividad GPx en hígado es aproximadamente 30 veces superior a la del cerebro y 5 veces a la del pulmón. En pulmón la edad produce un aumento significativa en la

actividad GPx, de 90.7 ± 9.8 mU/mg prot en 3M a 159.2 ± 10.4 mU/mg prot en 24 M ($+++p < 0.001$) y la HCl aumenta la actividad en tejido pulmonar ($*p < 0.05$). pero no en el tejido cerebral ni en el hepático.

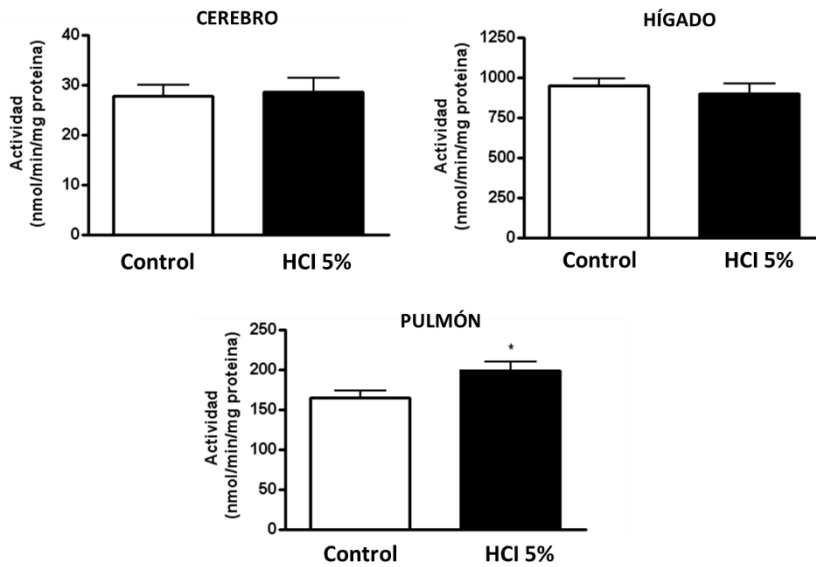


Figura 39: Actividad de la enzima GPx en homogenados de cerebro, hígado y pulmón de ratas viejas controles e HCl del 5% de O_2 . Datos presentados como medias \pm SEM, $n = 8$. $*p < 0.05$, HCl vs control.

3.2.2.2 Catalasa.

En la Fig. 40 se muestran los datos de la actividad de la catalasa en ratas de 24M de edad. La actividad de la catalasa es máxima en tejido hepático y esta es 10 veces superior a la del tejido pulmonar y 100 veces superior a la del tejido cerebral, al igual que ocurre en los animales de edad 3M. En animales de edad 3M HCl, la actividad catalasa hepática disminuye casi a la mitad mientras que en ratas 24M HCl existe una tendencia a aumentar que en ningún caso es significativa. La HCl en animales 24M, no produce ninguna alteración significativa en ninguno de los tejidos estudiados.

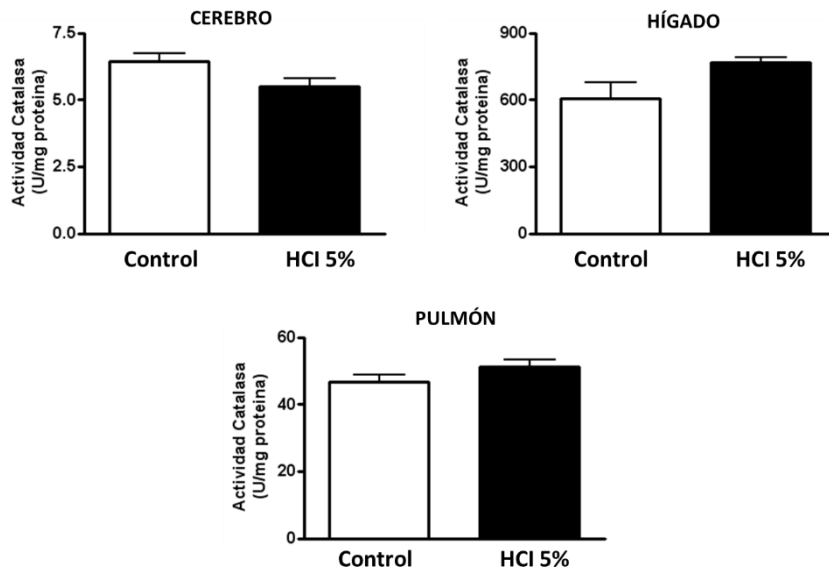


Figura 40: Actividad de la catalasa en homogenados de cerebro, pulmón e hígado, de animales viejos control y sometidos a HCl del 5% de intensidad de O₂. Datos son medias \pm SEM, n= 8.

3.2.2.3 Superóxido dismutasa SOD.

En la Fig. 41 se muestra la actividad de la superóxido dismutasa, tanto citosólica (Cu-Zn SOD), como mitocondrial (Mn SOD).

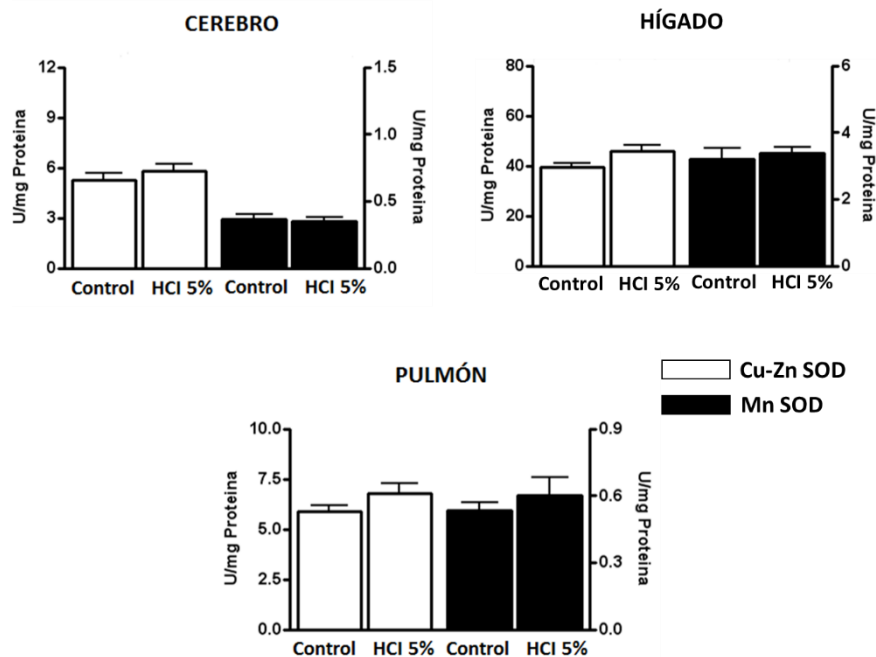


Figura 41: Actividades de la SOD mitocondrial (Mn-SOD) y citosólica (Cu Zn-SOD) en homogenados de hígado, pulmón y cerebro de animales viejos controles y sometidos HCl de 5% de intensidad de O₂. Datos son medias \pm SEM, n= 8.

Las actividades enzimáticas de la CuZn-SOD y Mn-SOD, en el tejido hepático, son más altas que las encontradas en tejido pulmonar y cerebral, la isoforma citoplasmática es la predominante 10-15 veces superior a la mitocondrial, esta observación es similar en

ratas 3M. La edad no modifica las actividades enzimáticas, excepto un marcado incremento de la enzima mitocondrial en tejido pulmonar que varía de 0.17 ± 0.12 U/mg prot) en animales jóvenes a 0.53 ± 0.11 U/mg prot en 24M. En ningún caso aparecieron diferencias significativas producidas por la exposición a HCl.

3.2.3 Proteína C reactiva.

La proteína C reactiva es sintetizada en el hígado como respuesta a mediadores inflamatorios y posteriormente liberada al plasma. La unión de esta proteína a las células endoteliales puede desencadenar la producción de especies reactivas de O_2 , creando un círculo vicioso que lleva al desarrollo de inflamación crónica y pérdida del fenotipo vaso relajante del endotelio (Zhang et al., 2012)

En la Fig. 42 se muestran los valores de proteína C reactiva plasmática en animales 24M y 24MHCl, los valores encontrados son semejantes a los encontrados en ratas 3M. No observándose diferencias significativas entre ambos grupos como consecuencia de la HCl no se modificaron estos valores.

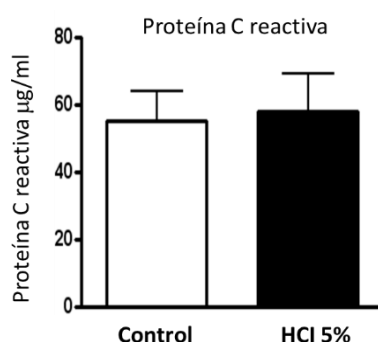


Figura 42: Niveles plasmáticos de proteína C reactiva en ratas 24M y 24M HCl de intensidad del 5% O_2 . Datos son medias \pm SEM, n= 6 controles y 6 HCl

3.3 Parámetros ventilatorios.

En la Fig. 43 se muestran los valores de frecuencia A), volumen corriente B) y volumen minuto C). Mientras los animales respiran atmósferas que contienen 21 (aire atmosférico), 12,10 y 7% O_2 balanceado con N_2 , y aire con 5% CO_2 . En aire el VM de las ratas 24M fue de 331.7 ± 53.5 ml/min/Kg y en ratas 24 MHCl 354.1 ± 51.9 ml/min/Kg. En atmósferas con bajo contenido de O_2 el VM aumentó en los dos grupos control e HCl, alcanzándose un máximo en la atmosfera del 7% de O_2 . En atmosfera de aire con 5% de CO_2 , el VM fue mayor que el encontrado en aire, esto mismo ocurre en ratas 3M. Las

ratas control 24M ventilan menos que las ratas control 3M, siendo la diferencia en la ventilación significativa, en todas las atmosferas ($p < 0,001$) excepto en aire ($p < 0,05$). La HCl no causó ninguna disminución en la ventilación en las ratas 24 M HCl, el VM fue estadísticamente idéntico en 24 M y 24 MHCl en todas las atmosferas

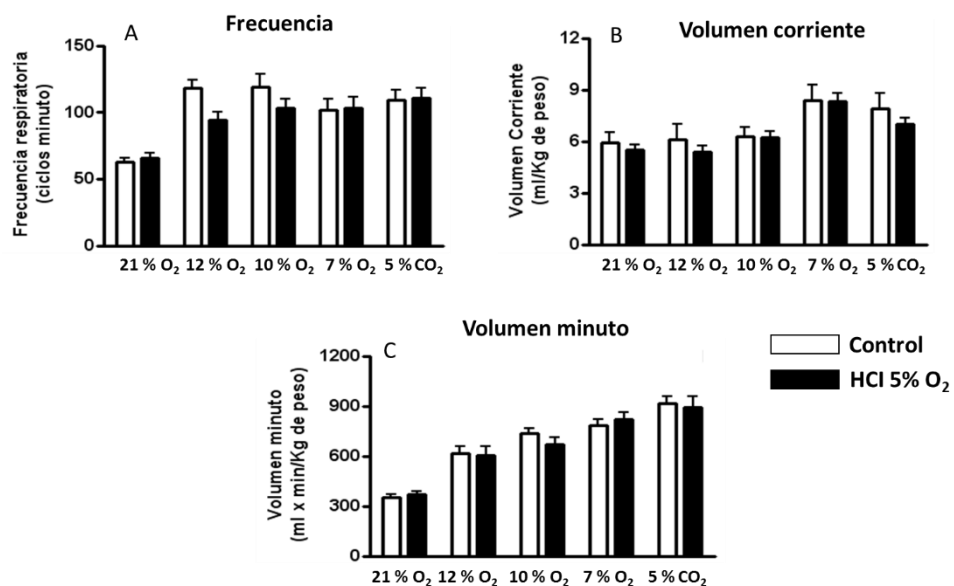


Figura 43: A) Frecuencia, B) volumen corriente y C) volumen minuto en ratas 24M y 24M HCl de intensidad del 5% O₂. Expuestas a atmosfera control (21% O₂), hipoxicas (12% O₂, 10% O₂, 7% O₂) e hipercápnica (5% CO₂). Datos son medias \pm SEM, n=8 controles e HCl.

3.4 Actividad del SNS

3.4.1 Niveles de catecolaminas en plasma, contenido y velocidad de síntesis de ³H-CA en arteria renal

Se valoraron los niveles plasmáticos de catecolaminas como indicadores de actividad del sistema simpático. En la figura 44 se muestran los niveles de E, NE y DA en plasma. Se observa un aumento significativo, en los niveles plasmáticos de E, producido por la HCl, no habiendo diferencias significativas ni en los valores de NE ni en los de DA.

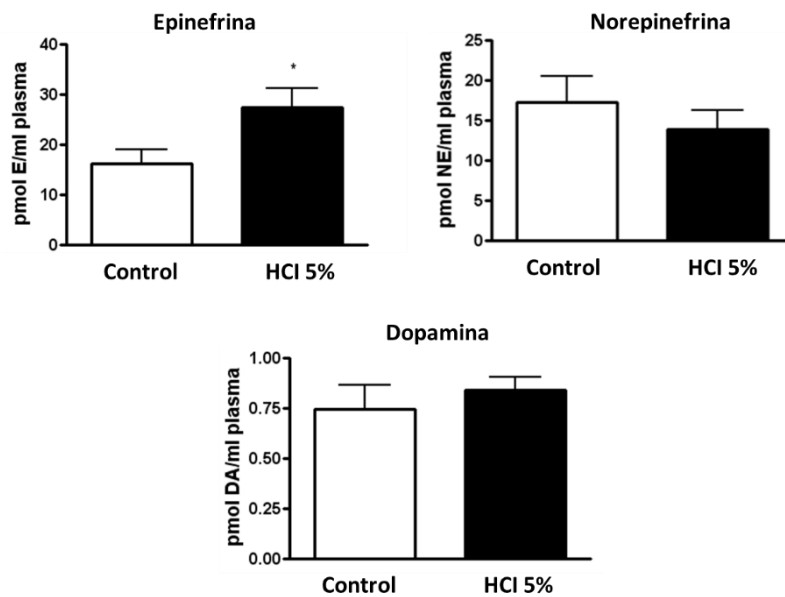


Figura 44: Contenido de Norepinefrina, Epinefrina y Dopamina en plasma de animales viejos controles e HCl del 5% de intensidad O₂. Datos son medias \pm SEM, n= 8 Norepinefrina y Epinefrina, Dopamina n= 6. *p< 0.05 control vs HCl.

3.4.2 Síntesis y contenido de Norepinefrina en Arteria Renal.

Con el fin de evaluar de una manera más precisa la actividad del SNS, se valora el contenido y la síntesis de norepinefrina en AR, como un indicador de la actividad catecolaminérgica en las fibras terminales simpáticas. En la Fig. 45 se presentan los datos de contenido y síntesis de NE. Se observa un aumento significativo en el contenido de NE en los animales sometidos a la HCl, mientras que en la síntesis se observa una disminución provocada por la HCl sin llegar a ser significativa.

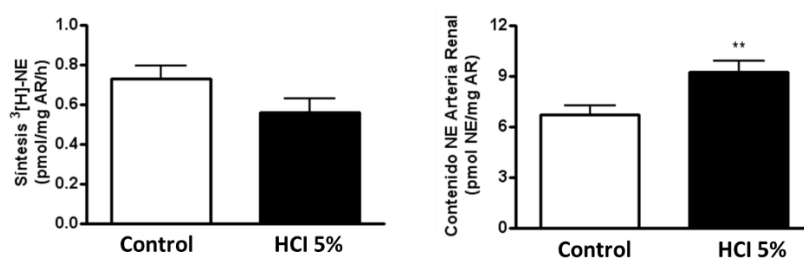


Figura 45: Contenido y síntesis de Norepinefrina en arteria renal. La síntesis medida como ³[H]-NE, en animales viejos control e HCl del 5% O₂. Datos son medias \pm SEM, n=24, **p< 0.01 control vs HCl en contenido, y n= 9 control vs n= 7 HCl.

3.4.2.1 Efectos de HCl sobre la presión arterial sistémica.

Es bien conocido como la edad causa un lento y constante aumento en la presión arterial, en humanos y animales de experimentación. (Soltis, 1987; Franklin et al., 1997; Safar et al., 2011; Wills et al., 2011). Las ratas 24 M muestran una presión arterial mayor

que las ratas 3M, 128.1 ± 26.9 mmHg y 101.9 ± 7.2 respectivamente, y al contrario de lo que ocurre en ratas jóvenes la HCl no modificó la presión arterial.

Se realizó un test de respuesta aguda a la Hipoxia y observamos, ver Fig. 46, y como cabía de esperar, la respuesta inducida por la Hipoxia fue una disminución de la presión arterial sistémica y una recuperación a los valores iniciales cuando de nuevo las ratas se situaban en normoxia.

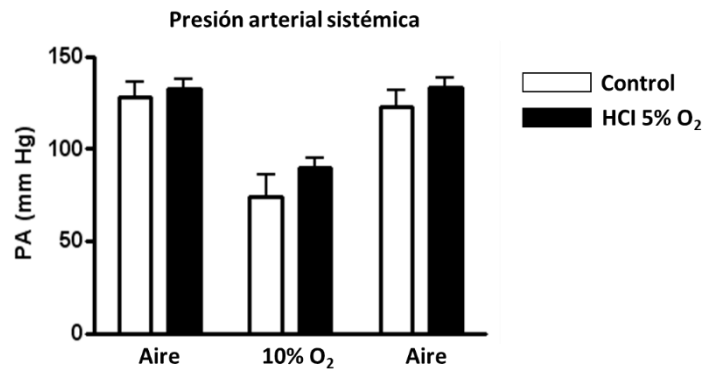


Figura 46: Presión arterial sistémica basal, después de la exposición a 3 minutos de Hipoxia aguda del 10% de O₂ y posterior recuperación, en ratas control e HCl del 5% de intensidad de O₂. Datos son medias \pm SEM, n= 11 HCl vs controles.

Discusión

En esta sección de discusión vamos a seguir el orden que hemos establecido en los objetivos y que hemos mantenido en los resultados a pesar de que implique algunas repeticiones. De forma que tras una breve discusión sobre el protocolo de HCl utilizado y algunas de sus consecuencias generales, discutiremos las modificaciones encontradas en el estado Redox tras el protocolo de HCl aplicado en animales jóvenes y en animales viejos. Posteriormente analizaremos las modificaciones que produce la HCl sobre la ventilación, el metabolismo de CA, como medida de la activación simpática y en la presión arterial.

Desde los trabajos de Fletcher (1992,1995) (ver introducción sección 6) en los cuales desarrolló un modelo de HCl, en ratas, que mimetizaba los perfiles de saturación de O₂ y el desarrollo de hipertensión que suceden en pacientes con apnea recurrente, después de la exposición a HCl durante 30 días, de forma sucesiva se han realizado numerosos estudios, en roedores, que han demostrado que la exposición prolongada a HCl, sin lugar a dudas, produce hipertensión, pero la magnitud y la aparición depende del modelo utilizado. Los estudios realizados, varían a) en intensidad de la hipoxia, la cual oscila desde anoxia N₂ a hipoxia de 3, 5, 6 y 10 % de O₂, b) en la duración del estímulo, varía desde 15 seg a 4 min, c) en el tiempo en el que se mantiene el protocolo de HCl desde 7 a 35 días y por último d) sistema empleado en la medida de la presión arterial, por telemetría, por cateterismo arterial o manguito en la cola.

El protocolo de HCl que se ha empleado en la elaboración de este trabajo de investigación, 40 seg hipoxia de intensidad 5 o 10 % O₂, seguida de 80 seg de normoxia, durante 8 horas al día, 15 días consecutivos. La medida de la presión arterial se realizaba mediante catéter en la arteria carótida, está dentro del amplio abanico que se cita en la bibliografía, por lo que pensamos que es adecuado para el abordaje de los objetivos propuestos.

Una relación cronológica y variada de los protocolos que utilizan HCl, puede verse en la tabla siguiente (Tabla VII). En ella incluimos el modelo utilizado por nosotros (Quintero 2015), que por su robustez y concordancia con los protocolos utilizados, puede ser válido e incluirse como uno más para estudiar los efectos de la HCl.

Tabla VII Protocolos de HCl, como ejemplos de los cambios de presión arterial dependiente de hipoxia intermitente, en ratas. (Tabla modificada de Prabhakar 2015)

Intensidad	Duración ciclo	Frecuencia ciclo	Cambio PA	Referencia
3% O ₂ 21%O ₂	30 seg 30 seg	60/h-8/24h	Aumento a los 35 días	Fletcher et al., 1992
5% O ₂ 21%O ₂	30 seg 30 seg	60/h-8/24h	Aumento a los 35 días	Fletcher et al., 1992
5% O ₂ -5% CO ₂ Aire,	90 seg 90 seg	20/h-8/24h	Aumento a los 11 días	Kanagy et al., 2001
10% O ₂ 21% O ₂	90 seg 90 seg	20/h-8/24h	Aumento a los 30 días	Hui et al., 2003
5% O ₂ 21%O ₂	40 seg 20 seg	60/h-8/24h	Aumento a los 35 días	Joyeux et al., 2005
5% O ₂ 21% O ₂	15 seg 9 min	9/h-8/24h	Aumento a los 10 días	Kumar et al., 2006
6%O ₂ 21% O ₂	40 seg 9 min	7/h-8/24h	Aumento a los 35 días	Zoccal et al., 2007
10% O ₂ 21% O ₂	75 seg 75 seg	24/h-3,5/24h	Aumento 7 días	Knigth et al., 2011
6%O ₂ Aire	40 seg 9 min	7/h-8/24h	Aumento a los 15 días	Silva et al., 2011
5% O ₂ Aire	40 seg 80 seg	30/h-8/24h	Aumento 15 días	Quintero 2015
10% O ₂ Aire	40 seg 80 seg	30/h-8/24h	Aumento 15 días	Quintero 2015

1 Efectos generales de la HCl en animales jóvenes y viejos.

Los animales jóvenes (3M) y viejos (24M) toleraron bien ambos tipos de protocolos de HCl aplicados sin modificarse en ningún caso el incremento de peso observado en los grupos controles. Por tanto se puede concluir que exponer a HCl a animales jóvenes o viejos no tiene efecto en los parámetros antropométricos.

Respecto a otras modificaciones generales hemos observado que tampoco hay modificaciones en el hematocrito y en la glucemia. El hecho de que no se modifique el hematocrito significa que el incremento previsible de HIF-1 no ha sido suficiente para el posterior incremento de EPO y el consecuente incremento de la eritrogénesis.

Previamente a tratar los efectos del HCl sobre el estado oxidativo conviene repasar alguno de nuestros hallazgos de manera general. Los resultados de los experimentos realizados en los 2 grupos de animales de 3M y 24 M, se pueden resumir y agrupar en tres categorías. El primero es la valoración de los biomarcadores como niveles de glutatión y E_{GSH} , niveles de peróxidos lipídicos y el cociente entre las actividades de las enzimas aconitasa y fumarasa, los cuales informan del estado redox general de los animales, apreciándose como la exposición a HCl produce estrés oxidativo en animales jóvenes 3M y no lo hace en ratas 24M. El segundo grupo donde se analizan los datos relacionados con las enzimas eliminadoras de ROS (GPx, catalasa y SOD), evidenciándose, de nuevo, la existencia de estrés oxidativo en ratas jóvenes y no en ratas 24M, corroborado por el hecho de que las actividades de las enzimas encargadas de mantener el equilibrio oxidante-antioxidante están alteradas, aunque la alteración debe ser tomada con cautela. Cabe preguntarse ¿es la HCl la causa que altera las enzimas antioxidantes o éstas están alteradas como consecuencia del estrés oxidativo ya presente? El tercer grupo de datos corresponde a indicadores de procesos proinflamatorios como el factor NF- κ B (subunidad p65 ReLA) y PCR, ambos relacionados con el estrés oxidativo.

Nuestros resultados indican una considerable variabilidad de los biomarcadores dependiendo del tejido analizado. El hecho de utilizar un amplio rango de biomarcadores de estrés oxidativo, así como la doble intensidad de hipoxia y los múltiples tejidos analizados, nos da evidencias que no todos los marcadores de estrés oxidativo lo detectan de igual manera y que los distintos tejidos responden al daño oxidativo de distinta forma. Esta distinta especificidad de los diferentes tejidos al daño oxidativo ya había sido observada con anterioridad (Jun et al., 2008). Al igual que en el presente estudio, Jun y col. observaron que el tejido hepático, en comparación con otros tejidos, es el más susceptible al daño oxidativo producido por la HCl y dado que el hígado es el órgano central del metabolismo, este sería el origen de los múltiples problemas metabólicos que presentan los pacientes con SAOS. Nuestro estudio muestra que el estrés oxidativo del hígado está asociado con la activación del factor NF- κ B y con la producción de PCR y en consecuencia con procesos inflamatorios y alteraciones metabólicas (Bowie et al., 2000; Korkmaz et al., 2012).

2 Estado redox en animales jóvenes 3M

Nuestros resultados indican que en los individuos jóvenes, incluso con HCl de intensidad moderada se produce estrés oxidativo, pudiéndose considerar al estrés oxidativo como causante primario de la patogénesis de diversas enfermedades asociadas al SAOS, sin olvidar que la sensibilización del CC, causada por la HCl, el aumento de la actividad del SNS y con ello su contribución a las patologías cardiovasculares y metabólicas encontradas en pacientes con SAOS y animales expuestos a HCl (Lesske et al., 1997; Prabhakar et al., 2005; Kohler et al., 2012).

2.1 Valoración de los biomarcadores

Respecto a los valores de Gst, GSH y GSSG mostrados en la tabla IV y los correspondientes a (E_{GSH}), ver Fig. 23, evidencian que los valores de glutatión y potenciales redox no se modifican en todos los tejidos explorados con ambas intensidades de HCl. Estas observaciones están de acuerdo con los hallazgos de otros autores (Jun et al., 2008). Hay que tener en cuenta que los contenidos de GSH/GSSG en células se encuentran en rangos milimolares (incluso 1000 veces mayor que los niveles de LPO), lo que implica una elevada capacidad de las células para eliminar el H_2O_2 . De manera que es necesario una exagerada producción de ROS para producir una disminución en el nivel de GSH o del E_{GSH} , pues mantener el E_{GSH} es un requisito indispensable para la homeostasis y supervivencia celular para evitar el inicio de procesos apoptóticos (Schafer et al., 2001). Por otro lado se confirma, con los valores obtenidos de glutatión, que el uso de un solo indicador, para valorar el estado oxidativo puede llevar a conclusiones erróneas, ya que utilizando otros marcadores, en los mismos animales o tejidos, puede demostrarse inequívocamente la existencia de daño oxidativo.

Observamos un incremento de la peroxidación lipídica en la Fig. 24 que ocurre exclusivamente en el tejido hepático. Se ha descrito (Jun et al., 2008) una sobreexpresión y activación de NADPH oxidasa hepática, por exposición a HCl, existiendo una asociación entre la peroxidación lipídica hepática y la producción de ROS por medio de la NADPH oxidasa.

Los datos que se presentan en la Fig. 25 hacen sospechar que el daño oxidativo observado en los niveles de peróxidos lipídicos, no está causado únicamente por la

acción de la NADPH oxidasa, sino que también intervienen ROS procedentes de la mitocondria. De hecho se ha demostrado en distintos modelos celulares y en respuesta a varios estímulos, evidencia de un movimiento bidireccional entre los ROS producidos a nivel mitocondrial y los producidos por la NADPH oxidasa. Por ejemplo, esto ocurre en células endoteliales, en las que la angiotensina II produce un incremento inicial en la producción de ROS debido a la activación de la NADPH oxidasa, lo que posteriormente desencadena una segunda activación en la producción de ROS a nivel mitocondrial (Daiber 2010). De manera similar en células de músculo liso de arteria pulmonar, se ha observado que la hipoxia produce una rápida producción de ROS a nivel mitocondrial, y que estos ROS mitocondriales producen la activación de la enzima NADPH oxidasa a través de una vía mediada por protein-quinasa C (Daiber 2010; Frazziano et al., 2011). Cualquiera que sea la secuencia de los mecanismos implicados en la producción de ROS, la disminución de la razón aconitasa/fumarasa observada en todos los tejidos estudiados, aplicando la HCl de mayor intensidad, pone de manifiesto un aumento de la producción del anión superóxido en la mitocondria, lo cual está de acuerdo con nuestras propuestas

Los mecanismos que conducen al aumento de producción de ROS son complejos y no están aún resueltos. Schumacker, después de numerosos trabajos e investigaciones, propone que la hipoxia produce un aumento de la producción de ROS a nivel del complejo III de la CTE mitocondrial (Schumacker 2011). La propuesta de Schumacker consiste en que el ubiquinol completamente reducido, difunde y se aloja en el complejo III, uniéndose en el sitio Q_0 de la membrana mitocondrial interna. Una vez unido se produce la transferencia de los dos electrones del ubiquinol siguiendo un orden preciso. El primer electrón se transfiere a la proteína ferro-sulfurada Rieske, de esta manera el ubiquinol se transforma en radical ubisemiquinona que tiene un solo electrón desapareado. La ubisemiquinona normalmente cede su electrón desapareado al citocromo b del complejo III de la cadena respiratoria, pero este electrón puede ser transferido de forma alternativa al O_2 reduciéndolo y formando de esta forma el radical superóxido. De cualquiera de las maneras la molécula oxidada resultante, denominada ubiquinona, entra de nuevo en el pool de las quinonas, preparada para aceptar de nuevo un nuevo par de electrones procedentes del complejo I o II, transformarse de nuevo en

ubiquinol y reiniciar el ciclo (Turrens 2003; Schumacker 2011). Sin embargo, el mecanismo por el cual se transfiere un electrón al O_2 formando $O_2^{\cdot-}$, en hipoxia, es desconocido (Waypa et al., 2008; Schumacker 2011), ya que la formación del anión $O_2^{\cdot-}$, como resultado de la transferencia de un electrón al O_2 , es directamente dependiente de la PO_2 (Turrens 2003), y como es obvio en hipoxia la PO_2 disminuye. Por lo tanto deben entrar en juego diversos factores adicionales para explicar el aumento de la producción de $O_2^{\cdot-}$ en hipoxia. Otra hipótesis es la propuesta por Taylor y Moncada (2010), en la cual el óxido nítrico (NO^{\cdot}) puede ser el protagonista. En dicha propuesta se indica que en normoxia, cuando el estado predominante de la citocromo oxidasa es el oxidado se une al NO^{\cdot} y lo oxida a nitrito, disminuyendo la disponibilidad de NO , mientras que en hipoxia cuando la proporción de citocromo oxidasa en estado reducido es la predominante, el NO^{\cdot} y el O_2 compiten por el sitio de unión a la citocromo oxidasa, el NO^{\cdot} con mayor afinidad que el O_2 , y en esta situación el NO^{\cdot} se acumula al no ser transformado en nitrito y la citocromo oxidasa permanece en su estado reducido. Esta situación hace que el NO^{\cdot} se acumule, y que los complejos proximales de la cadena transportadora de electrones se reduzcan, facilitando con ello la cesión de electrones desapareados al O_2 con la consiguiente formación de $O_2^{\cdot-}$. Esta hipótesis puede explicar, la disminución de la actividad de la aconitasa observada en la Fig. 25 debido a que el $O_2^{\cdot-}$ es el principal responsable de la inactivación de la aconitasa al desestructurar el centro activo $[4Fe-4S]^{2+}$ pasándolo a $[3Fe-4S]^{1+}$ y por tanto desactivando la enzima (Bulteau et al., 2003).

2.2 Enzimas eliminadores de ROS

La glutatión peroxidasa (GPx), comparte como sustrato el H_2O_2 con la catalasa, diferenciándose de ella, en que la GPx además necesita para llevar a cabo su reacción el glutatión reducido (GSH) como sustrato. De una manera general, la GPx supone la primera y principal línea de defensa frente al H_2O_2 en las células, aunque la catalasa también sería cuantitativamente importante. La HCl no produjo ningún efecto en los niveles de actividad de esta enzima (Fig. 26), salvo en el tejido pulmonar en que su actividad aumentó de forma dependiente a la intensidad de la HCl

Los datos presentados en la Fig. 27 señalan, que la HCl severa produce en hígado una disminución en la expresión de la catalasa, sin afectar a su actividad específica, ya que

la razón entre la actividad de la catalasa y la expresión de la enzima no se modifica tras HCl. De manera similar Haque et al., (2012) en líneas de células humanas de epitelio pigmentario retinal observan que el estrés oxidativo causa una inhibición post-transcripcional, mediada por micro-RNA, de la expresión de la catalasa. Podemos concluir que la disminución en la expresión de la catalasa observada en nuestro estudio puede ser el resultado de un proceso post-transcripcional.

La marcada disminución de la actividad de la SOD mitocondrial (Mn-SOD) en hígado, Fig. 28 puede ser explicada por un aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ y NO con la consiguiente formación de peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$), el cual puede nitrar el residuo 34 de la tirosina del enzima produciendo su inactivación (Yamakura et al., 2010). De igual forma el peroxinitrito formado puede nitrar el residuo de triptófano presente en la superóxido dismutasa citosólica (Cu,Zn-SOD), produciendo de igual manera su inactivación (Yamakura et al., 2010), pero hay que considerar que la regulación de las isoformas de la SOD es más compleja. La activación del factor NF- κ B, que también hemos encontrado en nuestros estudios, por los ROS lleva a un incremento en la expresión de SOD, aceptándose que la unión de esos eventos lleva al mantenimiento de la homeostasis redox intracelular (Ji 2008). Pero, esa secuencia de eventos no se observa en todos los tipos celulares y ante todos los estímulos (Lijnen et al., 2012). En nuestros resultados observamos una disminución en la expresión de Mn-SOD, producida por la HCl cercana al 25% en la intensidad moderada (HI 10% de O_2), y en torno al 35% en la HCl severa (HI 5% de O_2), además de disminuir su actividad alrededor del 70%. Esto implica por un lado que la HCl disminuye la expresión de la SOD, y por otro que la SOD expresada tiene una menor actividad probablemente causada por el daño oxidativo. Estos resultados son similares a los descritos por Nanduri y col. (Nanduri et al., 2009) en rata que observaron tras someterlas a HCl, una disminución en la expresión de Mn-SOD al igual que en cultivos celulares. Además estos autores observaron que la disminución de la expresión de Mn-SOD era debido a la disminución de los niveles de HIF-2 α , debido a su degradación vía proteasas dependientes de calpaina.

Todo lo anterior indica que el control de la Mn-SOD en HCl es multifactorial, y que como hemos mostrado existe una evidente disminución de la capacidad de dismutación del $O_2^{\cdot-}$ en tejidos hepático y cerebral en la situación de HCl más severa (HI 5% de O_2).

Por el contrario la Cu,Zn-SOD no ve afectada su expresión por la HCl y por lo tanto la disminución en la actividad de la isoforma citosólica debe ser atribuida al daño ocasionado por los ROS (Yamakura et al., 2010).

2.3 Marcadores proinflamatorios

Entre otros mecanismos dependientes de ROS en muchos sistemas celulares, está la activación del factor NF- κ B (Bowie et al., 2000; KorKmaz et al., 2012). Los miembros de la familia NF- κ B, en el citosol, forman complejos con la subunidad inhibitoria κ B, la cual después de su fosforilación por la quinasa, dependiente del estado redox, se separa del complejo NF- κ B, es ubiquitinizada y degradada. Los miembros del NF- κ B liberados (P65/p50) se translocan al núcleo y uniéndose a los promotores regulan la expresión de genes de citoquinas inflamatorias entre otras. Nuestros resultados muestran claramente el aumento del factor NF- κ B producido por la HCl ver Fig. 29 y por tanto indican el desarrollo de un estado proinflamatorio.

En resumen los resultados obtenidos en ratas jóvenes 3M indican que la HCl, incluso con intensidades moderadas, produce un estado oxidativo que es órgano específico. De los tres tejidos estudiados, el hígado es el órgano más sensible al daño oxidativo. El estado oxidativo se refleja por un aumento en los niveles de LPO y una disminución del cociente aconitasa/fumarasa, al igual que por modificaciones en las actividades de los enzimas eliminadores de ROS. El incremento de ROS conduciría a una activación en hígado de NF- κ B y secreción de la proteína C (ver Fig.30) reactiva aumentando de esta manera sus niveles plasmáticos.

3 Efecto de la HCl en ratas viejas 24M.

Nuestro hallazgo más notable es que la HCl, al contrario de lo que ocurre en los animales jóvenes 3M, no modifica ninguno de los parámetros utilizados para valorar el estrés oxidativo. La comparación con los hallazgos en animales 24 M indica que los animales viejos toleran la exposición a HCl de una manera más eficiente, sin los efectos deletéreos producidos por el aumento de ROS causados por la exposición a HCl. En la Fig 47 se muestra a modo de ejemplo la disminución del cociente Aconitasa/Fumarasa que sucede en 3M sometidos a HCl y la ausencia de efectos en 24M.

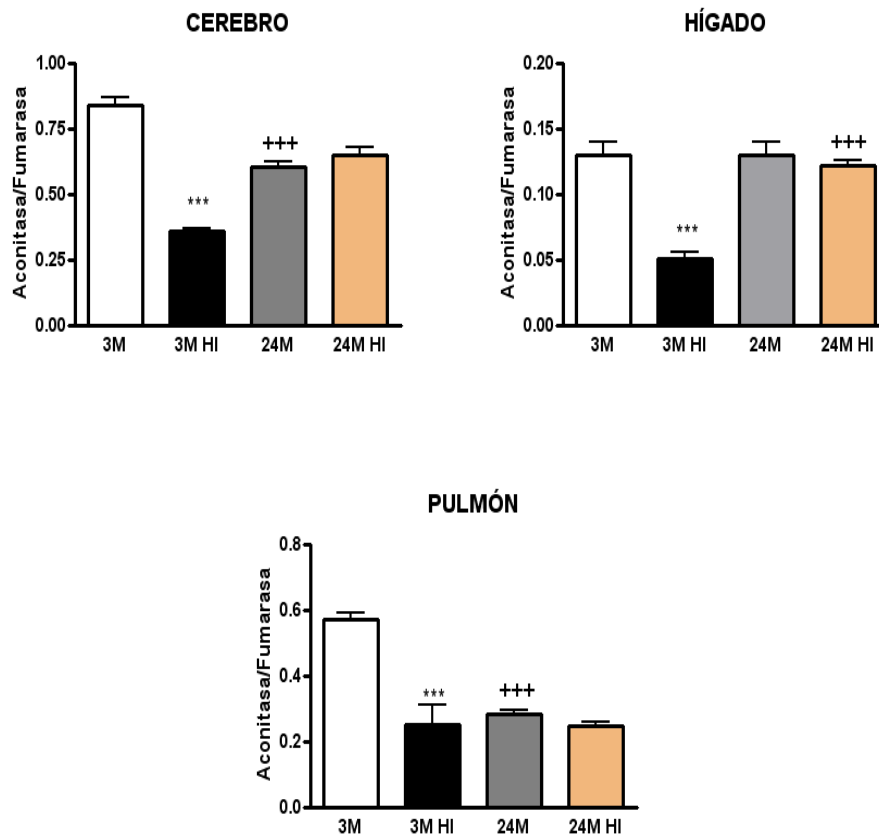


Figura 47: Comparación del efecto de la HCl de intensidad del 5% de O₂ en animales de 3 y 24 meses. 3M (control joven), 3M HI (hipóxico intermitente joven), 24M (control viejo), 24M HI (hipóxico intermitente viejo). +++ $p < 0.001$ jóvenes vs viejos (efecto de la edad), *** $p < 0.001$ control vs HI (efecto de la hipoxia intermitente).

Esta disminución de la actividad de la aconitasa puede ser un reflejo, al menos en parte, de la disminución de la actividad de la enzima dependiente de la edad y la disminución de la capacidad oxidativa mitocondrial (Delaval et al., 2004). El aumento de la actividad de la Mn-SOD precisamente en tejido pulmonar, puede suponer que el daño oxidativo a nivel mitocondrial no es la principal causa de la disminución de la actividad del cociente aconitasa/fumarasa.

Aunque es evidente que cada episodio de HCl puede ser considerada como una fuente de producción de ROS a nivel del endotelio celular (Lavie & Lavie 2009a; 2012). Nuestros resultados muestran que no se está produciendo daño oxidativo y que las posibles ondas de producción de ROS no parecen ser la causa del daño endotelial y de la remodelación permanente de los vasos sanguíneos en ratas viejas. Apoyando esta hipótesis un reciente estudio (Socha et al., 2015) ha observado, que la exposición

transitoria y prolongada a H₂O₂, es mejor tolerada por células endoteliales de ratas viejas, que por las provenientes de animales jóvenes. En ellas el incremento de calcio producido por la exposición transitoria a H₂O₂, es menor en el endotelio de animales viejos, así como la supervivencia y el mantenimiento de la integridad celular es mayor en animales viejos después de una exposición prolongada a H₂O₂.

4 Efecto de la edad sobre la respuesta ventilatoria tras la HCl

Estos resultados los vamos a discutir teniendo en cuenta otros hallazgos de nuestro grupo que se han realizado en colaboración con el grupo de la Dra. Silvia Conde de la Universidad Nova de Lisboa que han sido enviados a publicar. En dichos experimentos se encuentra que la exposición de los animales a la HCl tiene diferentes efectos sobre la actividad eléctrica del NSC dependiendo de la edad. En ratas jóvenes (3 M) la HCl produce un aumento de la sensibilidad de los CC ante test de hipoxias (5%O₂ y 0%O₂) medido como frecuencia de descargas en el NSC, lo que indica que la HCl hace a las ratas jóvenes hiperreactivas ante el estímulo hipóxico. Estos resultados están de acuerdo con experimentos previos de nuestro grupo en los que también se muestra que se mantiene o incluso disminuye su reactividad al CO₂ (González- Martín et al., 2011). En cuanto a las respuestas en ratas viejas, nuestro grupo ha publicado que el envejecimiento *per se* produce una disminución de la sensibilidad del CC a la hipoxia sin afectar a la hipercapnia (Conde et al., 2006). En los resultados sin publicar encontramos que los CC procedentes de ratas viejas sometidas a HCl, aplicando los mismos test de hipoxias que en jóvenes se observa un menor aumento del incremento de la frecuencia de descargas en el NSC, aunque todavía significativo.

Nuestros resultados muestran que se produce diferencias en los parámetros ventilatorios en animales jóvenes y viejos (ver tabla VIII y figura 48) como consecuencia de la distinta sensibilización originada por la HCl en el CC en diferentes edades frente a test de hipoxia. Por supuesto, en ambas edades someter a test de hipoxia se incrementa la ventilación. Así, hemos observado que en animales jóvenes la HCl causa una disminución en la ventilación minuto inducida por la hipoxia, mientras que en animales viejos este parámetro no se modifica tras la HCl.

Tabla VIII: Resumen de los efectos de la edad en los distintos parámetros valorados para cuantificar la respuesta ventilatoria. ↓ disminución del parámetro, (significación ↓ $p < 0.05$, ↓↓ $p < 0.01$, ↓↓↓ $p < 0.001$)

Test estimulantes	EFECTO DE LA EDAD 24M vs 3M		
	FRECUENCIA	VOLUMEN CORRIENTE	VOLUMEN MINUTO
21% O ₂	=	=	↓
12% O ₂	=	=	↓↓↓
10% O ₂	=	↓	↓↓↓
7% O ₂	=	↓↓	↓↓↓
5% CO ₂	=	↓↓	↓↓↓

Relacionando los resultados de la ventilación con la actividad del NSC, comentada anteriormente, podríamos decir que los animales jóvenes sometidos a HCI en comparación con animales controles, tienen aumentada la respuesta hipóxica del CC hacia el troncoencefalo, pero se produce una disminución significativa de la respuesta ventilatoria. Esto implicaría una mayor integración de la señal quimiorrectora pero que produce una pérdida de ganancia de la señal quimiorreceptora en los centros respiratorios. Esta pérdida de ganancia de la señal quimiorreceptora en los centros respiratorios, parece estar asociada con una facilitación de la señal quimiorreceptora a los centros encargados del control de las áreas vasomotoras del sistema simpático. Dicho de otra forma, la HCI produce cambios plásticos adaptativos limitando el incremento de la señal quimiorreceptora hacia los centros respiratorios para estabilizar la respiración durante la activación del reflejo quimiorreceptor por hipoxia severa, y por otro lado se facilita la transmisión quimiorreceptora para aumentar la respuesta del SNS (Kline 2010; Moraes et al., 2012; Almado et al., 2014).

Existen diversos estudios que proponen distintos mecanismos de adaptación de tipo plástico. Un estudio (Greenberg et al., 1999) mostró que la HCI induce la expresión de proteínas c-fos en zonas delimitadas de la médula oblongata relacionada con el tono y control reflejo de la actividad simpática, de manera que la HCI produce un aumento en la expresión de las proteínas c-fos en el NTS, el cual representa la primera estación del reflejo sensorial quimiorreceptor, también en la médula rostral ventrolateral, la cual

representa las neuronas pre-simpáticas, origen de la actividad del SNS que controla las funciones cardiovasculares (Guyenet 2000; Almado et al., 2014).

La causa de la disminución de la ventilación basal en animales viejos comparados con jóvenes, puede ser debido a una disminución en el estímulo quimiorreceptor del CC. En estudios previos realizados en nuestro laboratorio publicados (Conde et al., 2006), se demuestra y se discute en profundidad como la edad disminuye la respuesta hipóxica del CC e incluso existe una disminución en la masa de células quimiorreceptoras, un aumento en el recambio de neurotransmisores y cambios en la maquinaria de sensibilidad al O₂. La disminución de la respuesta quimiorreceptora sería el principal determinante de la baja ventilación de los animales viejos respecto de los jóvenes, pero esta disminución en la ventilación (ventilación minuto) en animales viejos, no implica forzosamente hipoventilación “funcional”, debido a que la edad va acompañada de una disminución en el consumo de O₂. De esta manera una progresiva y paralela disminución en ambos parámetros hace que se mantenga constante la ventilación alveolar por minuto, respecto al consumo de O₂ al minuto a lo largo de la vida de los individuos.

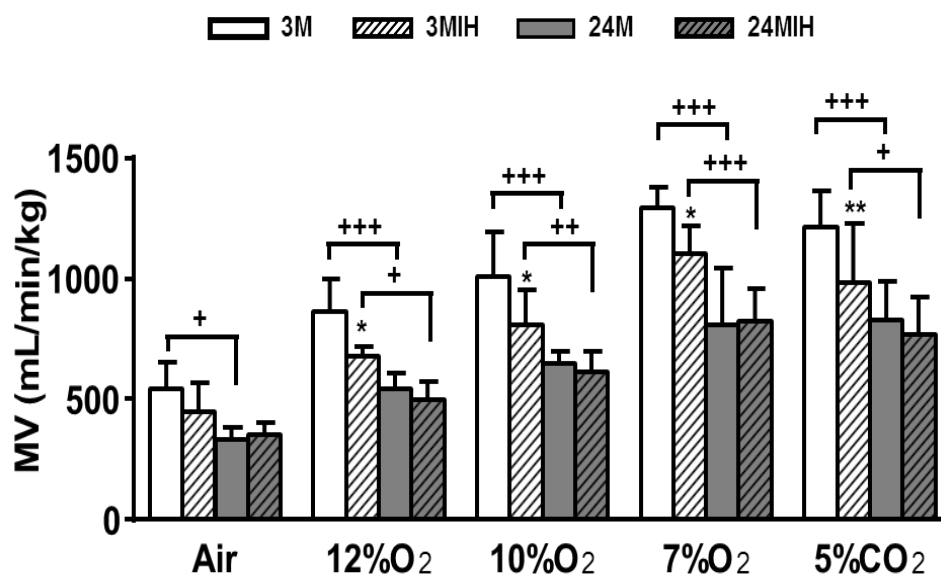


Figura 48: Comparación del efecto de la HCI de intensidad del 5% de O₂ en el volumen minuto de ratas de 3 y 24 meses sobre la ventilación minuto.. 3M (control joven), 3M HI (hipóxico intermitente joven), 24M (control viejo), 24M HI (hipóxico intermitente viejo). +++ p<0.001; ++p<0.01; + p<0.05 jóvenes vs viejos (efecto de la edad), **p<0.01; *p<0.05 control vs HI (efecto de la hipoxia intermitente).

Sin embargo aunque la HCI en individuos viejos, produce un cierto grado de sensibilización del CC, especialmente con hipoxias severas, estos individuos presentan una ventilación normal como respuesta a los test de hipoxia en animales sometidos previamente a HCI. Concluimos que a diferencia de los individuos jóvenes, en ratas viejas, la HCI no produce modificaciones adaptativas, de tipo plástico, en el sistema nervioso central, que sean capaces de producir una disminución de la ganancia del reflejo quimiorreceptor hacia los centros respiratorios y lo que es más importante, no se producen cambios plásticos facilitando la transferencia de la señal quimiorreceptora a las neuronas pre-simpáticas, no produciéndose de esta manera una hiperreactividad del SNS, ni llevaría en último término al desarrollo de hipertensión en los animales viejos, tal como nosotros hemos encontrado en nuestros resultados como discutiremos más adelante.

Antes de terminar la discusión sobre los efectos de la HCI en la ventilación es importante señalar que esta universalmente admitido el incremento de la sensibilidad del CC al igual que hemos mostrado en resultados pero sin embargo el efecto sobre la ventilación minuto es apreciado de una forma muy diferente. Unos autores encuentran que aumenta, disminuye (como hemos encontrado nosotros) o no tiene efecto. Es posible que estas diferencias se deban a las diferentes metodologías utilizadas por los diversos autores (Gonzalez et al., 2012). En este trabajo, se utilizó pletismografía de cuerpo entero en el que el animal está despierto y con libertad de movimiento, eliminándose posibles variables espúreas como los efectos de la anestesia, temperatura o variaciones de tipo circadiano.

En resumen, en nuestras condiciones observamos de forma consistente que la HCI produce una disminución de la ventilación en animales jóvenes (González-Martin et al., 2011; Olea et al., 2014), mientras que esto no ocurre en animales viejos, indicando que los cambios plásticos, adaptativos que tienen lugar en el sistema nervioso de individuos jóvenes y que en último término llevan al desarrollo de hipertensión (Prabhakar & Semenza 2012), no tienen lugar en individuos viejos.

5 Efecto de la edad sobre la actividad del sistema simpático tras HCI

Los datos que se muestran en las Fig 49, señalan un aumento de los niveles de epinefrina (E) y norepinefrina (NE) en plasma de animales jóvenes sometidos a HCI

respecto a los animales controles. Por el contrario en animales viejos sólo se incrementan los niveles de E y no de NE plasmáticas.

Como se ha indicado con anterioridad, la adaptación plástica de la señal quimiorreceptora, produce una facilitación de la actividad de las neuronas pre-simpáticas, produciendo un aumento del tono simpáticoadrenal, llevando ello hacia un aumento en la actividad simpática y por último un aumento en la presión arterial sistémica.

El aumento de los niveles plasmáticos de E indica un aumento en la actividad de los nervios espláncnicos que inervan las MAs (Xing & Pilowski 2010). Por otro lado el incremento de los niveles de NE en plasma, puede reflejar un aumento del tono simpático en amplias zonas corporales, ya que el pequeño porcentaje de NE proveniente de las MAs, al igual que la pequeña cantidad que es vertida al torrente sanguíneo desde las terminaciones simpáticas, puede ser recapturado y reciclado o bien metabolizado en gran medida. De esta manera el origen del estímulo, puede provenir de amplias zonas inervadas por el sistema simpático (Goldstein et al., 1983; Goldstein et al., 2003). De hecho, diversos autores encuentran que la hipoxia intermitente, tanto en modelos animales como en pacientes con AOS, aumenta las descargas del sistema simpático en nervios cervicales, torácicos, espláncnicos, renales y lumbares (Prabhakar et al., 2012). Sin embargo el aumento del tono simpático en individuos con AOS no es un fenómeno generalizado que afecte por igual a todo el sistema cardiovascular, como queda evidenciado por la ausencia de aumento de actividad simpática en la circulación cutánea (Grassi et al., 2014), pero está bien documentado, tanto en animales expuestos a HCI como en pacientes de AOS, el aumento del tono simpático de la circulación del músculo esquelético que representa el lecho de mayor importancia circulatoria.

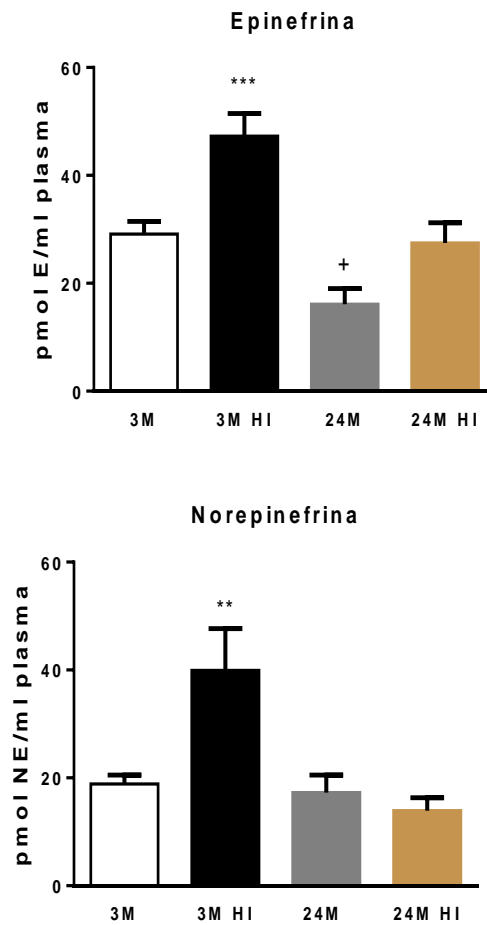


Figura 49: Comparación del efecto de la HCl de intensidad del 5% de O_2 en los niveles de catecolaminas plasmáticas, en animales de 3 y 24 meses. 3M (control joven), 3M HI (hipóxico intermitente joven), 24M (control viejo), 24M HI (hipóxico intermitente viejo). + $p < 0.05$ jóvenes vs viejos (efecto de la edad), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ control vs HI (efecto de la hipoxia intermitente).

Los datos además indican que el contenido en NE en AR es similar en animales jóvenes control y en animales viejos y que la HI en ambos casos incrementa el contenido de NE de forma significativa (figuras 33 y 45). Además en animales jóvenes la HCl produce un incremento en la síntesis, mientras que en los animales viejos la síntesis aumenta con la edad y disminuye con la exposición a HCl. Estos datos indican que la actividad simpática a nivel renal en individuos jóvenes está aumentada, sugiriendo que este aumento juega un papel fundamental en la génesis de hipertensión en individuos jóvenes expuestos a HCl (Fletcher et al., 1999; Linz et al., 2012). Por el contrario los individuos viejos presentan un aumento de la presión arterial sistémica dependiente de la edad, al igual que ocurre con los humanos (Soltis 1987; Franklin et al., 1997; Safar et al., 2011), haciéndolos ya de por sí hipertensos sin ser expuestos a HCl. El origen de la hipertensión sistémica en individuos viejos es multifactorial, donde además de un

aumento en la rigidez arterial, hay que considerar un incremento en la actividad simpática renal (Hart & Charkoudian 2014), como se puede apreciar por el aumento del recambio de NE en AR en ratas viejas vs controles jóvenes.

En la figura 50 se representan los valores de presión arterial en ratas de 3M y 24M en situación basal y tras HCl, también muestra el resultado de la aplicación de un test de hipoxia aguda. La disminución observada ante el test de hipoxia en cualquiera de los grupos se debe al efecto esperado de la hipoxia aguda sobre la vasodilatación periférica.

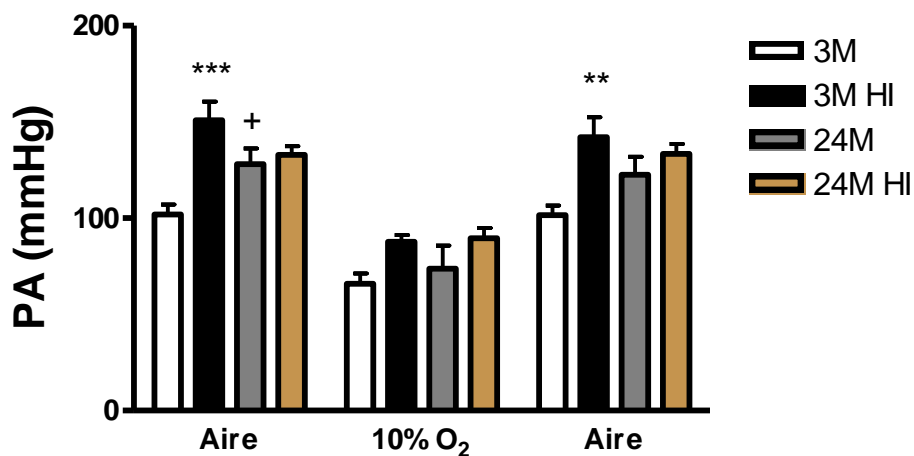


Figura 50: Comparación del efecto de la HCl de intensidad del 5% de O₂ en la presión arterial sistémica en animales de 3 y 24 meses. 3M (control joven), 3M HI (hipóxico intermitente joven), 24M (control viejo), 24M HI (hipóxico intermitente viejo). + $p < 0.05$ jóvenes vs viejos (efecto de la edad), ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ control vs HI (efecto de la hipoxia intermitente).

Una última consideración a tener en cuenta es la posible participación del reflejo barorreceptor en la hipertensión consecuente a la HCl pues como hemos comentado en la introducción se ha descrito por varios autores la aminoración de la sensibilidad de dicho reflejo tras la HCl (Lai et al., 2006; Prabhakar et al., 2012). De manera que dicha disminución de la sensibilidad de los barorreceptores haría que la respuesta simpática estuviera incrementada en estas situaciones.

Una vez conocidas la pérdida de plasticidad neuronal producida por la edad y los mecanismos sinápticos y extrasinápticos (Guzman-Karlsson et al., 2014), hay que mencionar la relación de los cambios adaptativos plásticos producidos por la HCl, y el efecto del estrés oxidativo. En individuos jóvenes el estrés oxidativo parece desencadenar los cambios plásticos, debido a una disminución en la actividad de HIF-2 y/o aumento de HIF-1 lo que lleva a una disminución en la expresión de la superóxido

dismutasa (SOD) y/o aumento de actividad NOX, siendo el consiguiente incremento del estrés oxidativo (Prabhakar & Semenza 2012) el desencadenante de la adaptación. Por el contrario en animales viejos, la HCI no causa una modificación en la actividad de ninguna de las enzimas comentadas, no se produce estrés oxidativo y en último término no se produce una modificación adaptativa del reflejo quimiorreceptor.

6 Consideraciones finales.

En base a los resultados presentados se puede concluir que la HCI tiene efectos distintos dependiendo de la edad.

En individuos jóvenes la HCI produce un estado oxidativo órgano dependiente y el estrés oxidativo. Según muestran otros autores (ver introducción) en el CC también se produce incremento de ROS que los sensibiliza, aumentando la señal quimiorreceptora hacia los centros integradores del troncoencefalo. En estos centros se produce una adaptación de tipo plástico que disminuye la señal sensorial hacia los centros respiratorios con la consiguiente hipoventilación observada, pero facilita la señal hacia las áreas presimpáticas. El aumento de la señal sensorial hacia el sistema simpático produce su activación y en último término el reflejo de esta activación es el aumento de la presión arterial sistémica en individuos jóvenes.

Tabla IX resumen del efecto de la HCI en distintos parámetros en individuos jóvenes y viejos respecto sus controles.

	Estrés oxidativo	Ventilación	Sistema nervioso simpático	Presión arterial sistémica
Ratas jóvenes HCI vs control	Aumenta	Disminuye	Activación	Hipertensión
Ratas viejas HCI vs control	No aumenta	No se modifica	Menor activación	No se modifica

En animales viejos no se observa ninguna variación de los parámetros oxidativos generales, lo cual implica que los individuos viejos toleran mejor la HCI sin los efectos patológicos consecuentes que estarían mediados por la activación de los mecanismos independientes de la activación simpática. En el CC sólo se produce una sensibilización moderada ante la HCI. No se produce una modificación adaptativa que facilite el tono simpático y no se produce hipoventilación. El resultado de esta situación es una menor

activación del sistema simpático que no llega a producir un aumento de la presión arterial sistémica (Prabhakar & Semenza 2012), aunque hay que recordar que los individuos viejos ya son hipertensos de por sí, debido al aumento de la presión arterial sistémica asociada a la edad.

En definitiva los datos presentados muestran que el envejecimiento ofrece una protección contra los efectos deletéreos patológicos que la HCl produce en las ratas jóvenes. Esta protección viene originada por la ausencia de estrés oxidativo y por consiguiente no se activan los mecanismos independientes del CC, así como la menor activación de la vía simpática que se origina en el CC. De manera que en animales viejos ambas vías patogénicas no se activan con la misma intensidad que los animales jóvenes.

Conclusiones

1. Diversos indicadores de estrés oxidativo, especialmente el cociente aconitasa/fumarasa, indican que la hipoxia crónica intermitente produce un estado prooxidativo general, en animales jóvenes, que produciría la activación de los mecanismos que denominamos directos o independientes de la activación simpática.
2. Al contrario de lo anterior los indicadores de estrés oxidativo no se modifican por la hipoxia crónica intermitente en ratas viejas
3. La hipoxia crónica intermitente en animales jóvenes produce una disminución de la ventilación minuto ante test de hipoxia o hipercapnia aguda, mientras que en ratas viejas no se modifica.
4. Los niveles plasmáticos de norepinefrina y epinefrina aumentan por la hipoxia crónica intermitente en ratas jóvenes mientras que en viejas sólo se modifica la epinefrina muy ligeramente.
5. El contenido de norepinefrina en arteria renal y su aumento por la hipoxia crónica intermitente son similares en ratas jóvenes y viejas.
6. La síntesis de norepinefrina en arteria renal aumenta por la hipoxia crónica intermitente en ratas jóvenes, mientras que en ratas viejas, que ya tienen aumentada su síntesis, la hipoxia crónica intermitente no la modifica.
7. Las tres conclusiones anteriores indican que en ratas jóvenes la hipoxia crónica intermitente activa el sistema nervioso simpático mientras que en ratas viejas el efecto es mucho menor. Esto indica que el mecanismo patogénico, mediado por el simpático, originado en el cuerpo carotideo, no está activado en ratas viejas.
8. De manera consecuente con la conclusión anterior y por el efecto del estrés oxidativo en ratas jóvenes la hipoxia intermitente crónica causa hipertensión sistémica, mientras que en ratas viejas que ya presentan la presión arterial basal aumentada no se modifica.
9. Como conclusión general podemos decir que las ratas viejas disponen de mecanismos protectores para que la HCl no produzca daño oxidativo ni activación simpática y que estos mecanismos protectores podrían ser los causantes de la no aparición de efectos patológicos asociados a la hipoxia crónica intermitente como la hipertensión arterial. Proponemos que la edad puede proporcionar una protección frente los efectos patológicos de AOS.

Bibliografía

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121-6. (1984).

Al-Barrak M., Shepertycky M. R., & Kryger M. H. Morbidity and mortality in obstructive sleep apnea syndrome. 2. Effect of treatment on neuropsychiatric morbidity and quality of life. *Sleep Biol. Rhythms.* 1(1):65-74. (2003).

Almado C. E., Leao R. M., & Machado B. H. Intrinsic properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic and bulbospinal respiratory neurons of juvenile rats are not affected by chronic intermittent hypoxia. *Exp. Physiol.* 99(7):937-950. (2014).

Almendros I., Montserrat J.M., Torres M., Gonzalez C., Navajas D., & Farré R. Changes in oxygen partial pressure of brain tissue in an animal model of obstructive apnea. *Respir. Res.* 11:3. (2010).

Almendros I., Wang Y., & Gozal D. The polymorphic and contradictory aspects of intermittent hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 15; 307(2):L129-40. Review. (2014).

Banno K., & Kryger M. H. Sleep apnea: clinical investigations in humans. *Sleep Med.* 8:400-426. (2007).

Bao G., Metreveli N., Li R., Taylor A., & Fletcher E.C. Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: role of the sympathetic nervous system. *J Appl Physiol.* 83:95–101. (1997).

Beckman J. S., & Koppenol W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271:C1424-1437. (1996).

Berger S., & Lavie L. Endothelial progenitor cells in cardiovascular disease and hypoxia-potential implications to obstructive sleep apnea. *Transl. Res.* 158:1-13. (2011).

Boger R. H. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Ann. Med.* 38(2):126-36. Review. (2006).

Boger R. H., Bode-Boger S. M., Szuba A., Tsao P. S., Chan J. R., Tangphao O., Blaschke T. F., & Cooke J. P. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation.* 98:1842–1847. (1998).

Bont de R., & van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis*. 19(3):169-185. (2004).

Bosc L. V., Resta T., Walker B., & Kanagy N. L. Mechanisms of intermittent hypoxia induced hypertension. *J. Cell. Mol. Med.* 14: 3–17. (2010).

Bouloukaki I., Mermigkis C., Kallergis E. M., Moniaki V., Mauroudi E. & Schiza S. E. Obstructive sleep apnea syndrome and cardiovascular disease: The influence of C-reactive protein. *World J. Exp. Med.* 20;5(2):77-83. Review. 2015.

Bowie A. & O'Neill L. A. Oxidative stress and nuclear factor-Kappa β activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries. *Biochem. Pharmacol.* 59:13-23. (2000).

Bradford M. M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248–254. (1976).

Bulteau A. L., Ikeda-Saito M., & Szweda L. I. Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria. *Biochemistry* 42:14846-14855. (2003).

Cadenas E. & Sies H. The lag phase. *Free Radic. Res.* 28:601-609. (1998).

Cadenas E., Boveris A., Ragan C. I., & Stoppani A. O. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinolcytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 180:248–257. (1977).

Campanucci V.A., Fearon I.M., & Nurse C.A. O₂-Sensing mechanism in efferent neurons to the rat carotid body. *Adv. Exp. Med. Biol.* 536:179-185. (2003).

Cantu D., Schaack J., & Patel M. Oxidative inactivation of mitochondrial aconitase results in iron and H₂O₂-mediated neurotoxicity in rat primary mesencephalic cultures. *PLoS ONE*. 4(9):e7095. (2009).

Castro F de. Sur la structure et l'innervation de la glande intercarotidienne (glomus caroticum) de l'homme et des mammifères, et sur nouveau système d'innervation autonome du neft glossopharyngien. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid.* 24:330-380. (1926).

Chaudhary B., Dasti S., Park Y., Brown T., Davis H., & Akhtar B. Hour-to-hour variability of oxygen saturation in sleep apnea. *Chest*. 113:719-722. (1998).

Chen J., He L., Dinger B., & Fidone S. Cellular mechanism involved in rabbit carotid body excitation elicited by endothelin peptides. *Respir. Physiol*. 121:13-23. (2000).

Chen Y.R., Chen C. L., Zhang L., Green-Church K. B., & Zweier J.L. Superoxide generation from mitochondrial NADH dehydrogenase induces self-inactivation with specific protein radical formation. *J. Biol. Chem*. 280:37339-37348. (2005).

Chiang A. A. Obstructive Sleep Apnea and Chronic Intermittent Hypoxia: A Review. *Chinese Journal of Physiology*. 49(5): 234-243. (2006).

Chitravanshi V. C., & Sapru H.N. Chemoreceptor-sensitive neurons in commissural subnucleus of nucleus tractus solitarius of the rat. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 268:R851–R858. (1995).

Cistulli P.A., & Sullivan C. E. Pathophysiology of sleep apnea. In *Sleep and Breathing*, ed. Saunders N. A. & Sullivan C.E., pp. 405–448. Dekker, New York. (1994).

Conde S. V., Obeso A., Rigual R., Monteiro E. C., & Gonzalez C. Function of the rat carotid body chemoreceptors in ageing. *J. Neurochem*. 99:711-723. (2006).

Conde S. V., Sacramento J. F., Guarino M. P., Gonzalez C., Obeso A., Diogo L. N., Monteiro E. C., & Ribeiro M. J. Carotid body, insulin, and metabolic diseases: unraveling the links. *Front Physiol*. 29:5:418. Review.(2014).

Coughlin S. R., Mawdsley L., Mugarza J. A., Calverley P. M., & Wilding J. P. Obstructive sleep apnea is independently associated with an increased prevalence of metabolic syndrome. *Eur. Heart J*. 25:735-741. (2004).

Couplan E., Del Mar Gonzalez-Barroso M., Alves-Guerra M. C., 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*. 277:26268-26275. (2002).

Daiber A. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Acta.* 1797:897-906. (2010).

Delaval E., Perichon M., & Friguet B. Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart. *Eur. J. Biochem.* 271(22):4559-4564. (2004).

Dempsey J. A., Veasey S. C., Morgan B. J., & O'Donnell C. P. Pathophysiology of sleep apnea. *Physiol. Rev.* 90: 47-112. (2010).

Dempsey J. A., Xie A., Patz D. S., & Wang D. Physiology in medicine: obstructive sleep apnea pathogenesis and treatment--considerations beyond airway anatomy. *J. Appl. Physiol.* (1985). 116(1): 3-12. (2014).

Dhamrait S. S., Stephens J. W., Cooper J. A., Acharya J., Mani A. R., Moore K., Miller G. J., Humphries S. E., Hurel S. J., & Montgomery H. E. Cardiovascular risk in healthy men and markers of oxidative stress in diabetic men are associated with common variation in the gene for uncoupling protein 2. *Eur. Heart J.* 25:468-475. (2004).

Doherty L. S., Kiely J. L., Swan V., & McNicholas W. T. Long-term effects of nasal continuous positive airway pressure therapy on cardiovascular outcomes in sleep apnea syndrome. *Chest.* 127(6):2076-2084. (2005).

Dyugovskaya L., Lavie P., & Lavie L. Phenotypic and functional characterization of blood gammadelta T cells in sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168:242-249. (2003).

Elwood P., Hack M., Pickering J., Hughes J., & Gallacher J. Sleep disturbance, stroke, and heart disease events: evidence from the Caerphilly cohort. *J Epidemiol Community Health.* 60(1):69-73. (2006).

Engleman H.M., Cheshire K. E., Deary I. J., & Douglas N. J. Daytime sleepiness, cognitive performance and mood after continuous positive airway pressure for the sleep apnoea/hypopnoea syndrome. *Thorax.* 48(9):911-914. (1993).

Fava C., Montagnana M., Favalaro E.J., Guidi G.C., & Lippi G. Obstructive sleep apnea syndrome and cardiovascular diseases. *Semin. Thromb. Hemost.* 37(3):280-297. (2011).

Feng J., Chen B.-Y., & Cui L.-Y. Carotid body-mediated changes of sympathetic nerve and their relationships with hypertension. *Chin. Med. J.* 121(17):1732-1735. (2008).

Fenton H. J. H. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J. Chem. Soc. Trans.* 65:899-910. (1894).

Fidone S. & Gonzalez C. Catecholamine synthesis in rabbit carotid body in vitro. *J. Physiol.* 333:69-79. (1982).

Fletcher E.C., Bao G., & Li R. Renin activity and blood pressure in response to chronic episodic hypoxia. *Hypertension.* 34(2):309-314. (1999).

Fletcher E.C., Bao G., & Miller C.C. 3rd. Effect of recurrent episodic hypocapnic, eucapnic, and hypercapnic hypoxia on systemic blood pressure. *J. Appl. Physiol.* 78(4):1516-1521. (1995).

Fletcher E.C., Lesske J., Behm R., Miller C.C. 3rd., Stauss H., & Unger T. Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. *J. Appl. Physiol.* 72:1978-1984. (1992a).

Fletcher E.C., Lesske J., Culman J., Miller C. C., & Unger T. Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation in episodic hypoxia. *Hypertension (J. Am. Heart Assoc.)*. 20(5):612-619. (1992 b).

Franklin S. S., Gustin W. 4th, Wong N. D., Larson M. G., Weber M. A., Kannel W. B., & Levy D. Hemodynamic patterns of age-related changes in blood pressure. The Framingham Heart Study. *Circulation.* 96(1):308-315. (1997).

Frazziano G., Moreno L., Moral-Sanz J., Menendez C., Escolano L., Gonzalez C., Villamor E., Alvarez-Sala J. L., Cogolludo A. L., & Perez-Vizcaino F. Neutral sphingomyelinase, NADPH oxidase and reactive oxygen species: role in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J. Cell Physiol.* 226:2633-2640. (2011).

Goldstein D. S., Eisenhofer G., & Kopin I. J. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305:800-811. (2003).

Goldstein D. S., McCarty R., Polinsky R. J., & Kopin I. J. Relationship between plasma norepinephrine and sympathetic neural activity. *Hypertension.* 5(4):552-559. (1983).

Gómez-Niño A., Agapito M.T., Obeso A., & González C. Effects of mitochondrial poisons on glutathione redox potential and carotid body chemoreceptor activity. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 165:104–111. (2009).

Gonzalez C. Sensitive to physiological hypoxia. In: *Oxygen Regulation of Ion channels and gene expression.* (Eds. Weir, E.K. and López-Barneo, J). Futura publishing Co. Inc. Armonk, NY, pp321-336. (1998).

González C., Agapito M.T., Rocher A., González-Martin M.C., Vega-Agapito V., Gomez-Niño A., Rigual R., Castañeda J., & Obeso A. Chemoreception in the context of the general biology of ROS. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 157: 30–44. (2007).

González C., Almaraz L., Obeso A., & Rigual R. Carotid body chemoreceptors: From natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev.* 74: 829-98. (1994).

González C., Almaraz L., Obeso A., & Rigual R. Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors. *Trends Neurosci.* 15:146-53. (1992).

Gonzalez C., Conde S. V., Gallego-Martín T., Olea E., Gonzalez-Obeso E., Ramirez M., Yubero S., Agapito M. T., Gomez-Niño A., Obeso A., Rigual R., & Rocher A. Fernando de Castro and the discovery of the arterial chemoreceptors. *Front Neuroanat.* May 12; 8:25. (2014).

Gonzalez C., Lopez-Lopez J. R., Obeso A., Perez-Garcia M. T., & Rocher A. Cellular mechanisms of oxygen chemoreception in the carotid body. *Respir. Physiol.* 102 (2-3):137-47. (1995).

Gonzalez C., Sanz-Alfayate G., Obeso A., & Agapito M.T. Role of glutathione redox state in oxygen sensing by carotid body chemoreceptor cells. *Methods Enzymol.* 381:40-71. (2004).

Gonzalez C., Yubero S., Gomez-niño M. A., Agapito T., Rocher A., Rigual R., Obeso A., & Montserrat J. M. Some reflections on intermittent Hypoxia. Does it constitute the translational niche for carotid body chemoreceptor researchers? *Adv. Exp. Med. Biol.* 758:333-342. (2012).

González-Martin M. C., Vega-Agapito M. V., Conde S. V., Catañeda J., Bustamante R., Olea E., Perez-Vizcaino F., Gonzalez C., & Obeso A. Carotid body function and ventilatory responses in intermittent hypoxia. Evidence for anomalous brainstem integration of arterial chemoreceptor input. *J. Cell. Physiol.* 226:1961-1969. (2011).

Gorlach A., & Bonello S. The cross-talk between NF-kappaB and HIF-1: further evidence for a significant liaison. *Biochem. J.* 412: e17-e19. (2008).

Gozal D. CrossTalk proposal: the intermittent hypoxia attending severe obstructive sleep apnoea does lead to alterations in brain structure and function. *Physiol.* 591 (Pt 2):379-81. (2013).

Grassi G., Seravalle G., Brambilla G., Buzzi S., Volpe M., Cesana F., Dell'oro R., & Mancina G. Regional differences in sympathetic activation in lean and obese normotensive individuals with obstructive sleep apnoea. *J. Hypertens.* 32(2):383-388. (2014).

Grebe M., Eisele H. J., Weissmann N., Schaefer C., Tillmanns H., Seeger W., & Schulz R. Antioxidant vitamin C improves endothelial function in obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173:897–901. (2006).

Gredilla R., Barja G., & Lopez-Torres M. Effect of short term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33: 279-287. (2001).

Greenberg H. E., Sica A. L., Scharf S. M., & Ruggiero D. A. Expression of c-fos in the rat brainstem after chronic intermittent hypoxia. *Brain Res.* 816(2):638-645. (1999).

Grimpen F., Kanne P., Schulz E., Hagenah G., Hasenfuss G., & Andreas S. Endothelin-1 plasma levels are not elevated in patients with obstructive sleep apnoea. *Eur. Respir. J.* 15:320-325. (2000).

Guyenet P. G. Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. *Respir. Physiol.* 121(2-3):147-162. (2000).

Guzman-Karlsson M. C., Meadows J. P., Gavin C. F., Hablitz J. J., & Sweatt J. D. Transcriptional and epigenetic regulation of Hebbian and non-Hebbian plasticity. *Neuropharmacology.* 80:3-17. (2014).

Halliwell B., & Gutteridge J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth ed. Oxford University Press. Oxford UK. (2007).

Halliwell B., & Lee C. Y. Using isoprostanes as biomarkers of oxidative stress: some rarely considered issues. *Antioxid. Redox Signal.* 13:145–156. (2010).

Halliwell B., Aeschbach R., Loliger J., & Aruoma O. I. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* 33:601-617. (1995).

Haque R., Chun E., Howell J. C., Sengupta T., Chen D., & Kim H. Micro RNA-30b-mediated regulation of catalase expression in human ARPE-19 cells. *PLoS One.* 7:e42542; (2012).

Hart E. C., & Charkoudian N. Sympathetic neural regulation of blood pressure: influences of sex and aging. *Physiology (Bethesda).* 29(1):8-15. (2014).

Hui A. S., Striet J. B., Gudelsky G., Soukhova G. K., Gozal E., Beitner-Johnson D., Guo S. Z., Sachleben L. R., Haycock J. W., Gozal D., & Czyzyk-Krzeska M. F. Regulation of catecholamines by sustained and intermittent hypoxia in neuroendocrine cells and sympathetic neurons. *Hypertension.* 42:1130-1136. (2003).

Iesato K., Tatsumi K., Saibara T., Nakamura A., Terada J., Tada Y., Sakao S., Tanabe N., Takiguchi Y., & Kuriyama T. Decreased lipoprotein lipase in obstructive sleep apnea syndrome. *Circ. J.* 71:1293-1298. (2007).

Imlay J. A., & Fridovich I. Assay of metabolic superoxide production in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 266: 6957–6965. (1991).

Iturriaga R., Moya E. A., & del Rio R. Inflammation and oxidative stress during intermittent hypoxia: the impact on chemoreception. *Exp. Physiol.* 0.0:1-7. (2014).

Jelic S., Lederer D. J., Adams T., Padeletti M., Colombo P. C., Factor P. H., & Le Jemtel T. H. Vascular inflammation in obesity and sleep apnea. *Circulation*. 121:1014-21. (2010).

Jelic S., Padeletti M., Kawut S.M., Higgins C., Canfield S.M., Onat D., Colombo P.C., Basner R.C., Factor P., & Le Jemtel T.H. Inflammation, oxidative stress, and repair capacity of the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Circulation*. 117:2270-2278. (2008).

Ji L. L. Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: role of redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* 44:142-152. (2008).

Joyeux-Faure M., Stanke-Labesque F., Lefebvre B., Beguin P., Godin-Ribout D., Ribout C., Launois S. H., Bessard G., & Levy P. Chronic intermittent hypoxia increases infarction in the isolated rat heart. *J. Appl. Physiol.* (1985). 98:1691-1696. (2005).

Jun J., Savransky V., Nanayakkara A., Bevans S., Li J., Smith P.L., & Polotsky V.Y. Intermittent hypoxia has organ-specific effects on oxidative stress. *Am. J. Physiol. Regul. Comp. Physiol.* 295:1274-1281. (2008).

Kandel E. Sleep and dreaming. In: *Principles of neural science*. Fourth edition. 47:937-946. (2000).

Kara T., Narkiewicz K., & Somers V. K. Chemoreflexes—physiology and clinical implications. *Acta Physiol. Scand.* 177:377–384. (2003).

Kato M., Adachi T., Koshino Y., & Somers V. K. Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease. *Circ. J.* 73: 1363-1370. (2009).

Kent B. D., Ryan S., & McNicholas W. T. Obstructive sleep apnea and inflammation: relationship to cardiovascular co-morbidity. *Respir Physiol Neurobiol.* 178(3):475-81. Review. (2011).

Khan S. A., Nanduri J., Yuan G., Kinsman B., Kumar G. K., Joseph J., Kalyanaraman B., & Prabhakar N.R. NADPH oxidase 2 mediates intermittent hypoxia-induced mitochondrial complex I inhibition: relevance to blood pressure changes in rats. *Antioxid.Redox Signal.* 14:533–542. (2011).

Kinnula V. L., & Crapo J. D. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 167:1600–1619. (2003).

Kirkman H. N., Rolfo M., Ferraris A. M., & Gaetani G. F. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J. Biol. Chem.* 274:13908-13914. (1999).

Kline D. D. Chronic intermittent hypoxia affects integration of sensory input by neurons in the nucleus tractus solitarii. *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 174:29-36. (2010).

Kline D. D., Ramirez-Navarro A., & Kunze D. L. Adaptive depression in synaptic transmission in the nucleus of the solitary tract after in vivo chronic intermittent hypoxia: evidence for homeostatic plasticity. *J. Neurosci.* 27:4663–4673. (2007).

Knight W. D., Little J. T., Carreno F. R., Toney G. M., Mifflin S. W., & Cunningham J. T. Chronic intermittent hypoxia increases blood pressure and expression of FosB/DeltaFosB in central autonomic regions. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301:R131-R139. (2011).

Kohler M., & Stradling J. R. Cross talk proposal: most of the cardiovascular consequences of OSA are due to increased sympathetic activity. *J. Physiol.* 590:2813-2815. (2012).

Korkmaz A., Rosales-Corral S., & Reiter R. J. Gene regulation by melatonin linked to epigenetic phenomena. *Gene.* 503:1-11. (2012).

Kraiczi H., Hedner J., Peker Y., & Grote L. Comparison of atenolol, amlodipine, enalapril, hydrochlorothiazide, and losartan for antihypertensive treatment in patients with obstructive sleep apnea. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161:1423-1428. (2000).

Kritchevsky S.B., Cesari M., & Pahor M. Inflammatory markers and cardiovascular health in older adults. *Cardiovasc Res.* 66(2):265-75. (2005).

Kumar G. K., Nanduri J., Peng Y.J., & Prabhakar N.R. Neuromolecular mechanisms mediating the effects of chronic intermittent hypoxia on adrenal medulla. *Respir. Physiol. Neurobiol.* Apr; 209:115-9. doi: 10.1016/j.resp.2015.01.001. Epub 2015 Jan 10. Review. 209:115-119. (2015)

Kumar G. K., Rail V., Sharmal S. D., Ramakrishnan D. P., Peng Y. J., Souvannakitti D., & Prabhakar N. R. Chronic intermittent hypoxia induces hypoxia-evoked catecholamine efflux in adult rat adrenal medulla via oxidative stress. *J. Physiol.* 575. 1(2006) pp 229–239. (2006).

Kyzer S., & Charuzi I. Obstructive sleep apnea in the obese. *World. J. Surg.* 22:998-1001. (1998).

Lai C. J., Yang C. C., Hsu Y. Y., Lin Y. N., & Kuo T. B. Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats. *J. Appl. Physiol.* 100:1974-1982. (2006).

Lam S. Y., Liu Y., Ng K. M., Liong E. C., Tipoe G. L., Leung P. S., & Fung M. L. Upregulation of a local renin–angiotensin system in the rat carotid body during chronic intermittent hypoxia. *Exp. Physiol.* 99:220–231. (2014).

Lam S. Y., Tipoe G. L., Liong E. C., & Fung M. L. Hypoxia-Inducible factor (HIF)-1 α and Endothelin-1 expression in the rat carotid body during Intermittent. *Adv. Exp. Med. Biol.* 580, 21–27. (2006).

Lam S. Y., Tipoe G. L., Liong E. C., & Fung M. L. Differential expressions and roles of hypoxia-inducible factor-1 α , -2 α and -3 α in the rat carotid body during chronic and intermittent hypoxia. *Histol. Histopathol.* 23:271–280. (2008).

Lavie L., & Lavie P. Cross Talk opposing view: Most cardiovascular diseases in sleep apnoea are not caused by sympathetic activation. *J. Physiol.* 590:2817-9. (2012).

Lavie L., & Lavie P. Molecular mechanism of cardiovascular disease in OSAHS: the oxidative stress link. *Eur. Respir. J.* 33:1467-1484. (2009).

Lavie P., & Lavie L. Unexpected survival advantage in elderly people with moderate sleep apnoea. *J. Sleep Res.* 18: 397–403. (a)(2009).

Leeman M., de Beyl V. Z., Biarent D., Maggiorini M., Melot 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.* 159(5Pt 1):1383-1390. (1999).

Lesske J., Fletcher E. C., Bao G., & Unger T. Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia – influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system. *J. Hypertens.* 15:1593–1603. (1997).

Leung R. S. T., Comondore V. R., Ryan C. M., & Stevens D. Mechanism of sleep-disordered breathing: causes and consequences. *Eur. J. Physiol.* 463:213–230. (2012).

Levy P., Kholer M., McNicholas W. T., Barbé F., McEvoy R. D., Somers V. K., Lavie L., & Pepin J. L. Obstructive sleep apnoea syndrome. *Nature Reviews.* 1:1-20. (2015).

Lijnen P. J., van Pelt J. F., & Fagard R. H. Stimulation of reactive oxygen species and collagen synthesis by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Cardiovasc. Ther.* 30:e1-8. (2012).

Limberg J. K., Curry T. B., Prabhakar N. R., & Joyner M. J. Is insulin the new intermittent hypoxia? *Med. Hypotheses.* 82(6):730-5. (2014).

Lindenau J., Noack H., Possel H., Asayama K., & Wolf G. Cellular distribution of superoxide dismutases in the rat CNS. *Glia.* 29:25-34. (2000).

Linz D., Mahfoud F., Schotten U., Ukena C., Neuberger H. R., Wirth K., & Bohm M. Renal sympathetic denervation suppresses postapneic blood pressure rises and atrial fibrillation in a model for sleep apnea. *Hypertension.* 60(1):172-178. (2012).

Logan A. G., Perlikowski S. M., Mente A., Tisler A., Tkacova R., & Niroumand M. High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug-resistant hypertension. *J. Hypertens.* 19:2271-2277. (2001).

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., & Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275. (1951).

Lurie A. Cardiovascular disorders associated with obstructive sleep apnea. *Adv. Cardiol.* 46:197-266, (2011).

Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin. Chim. Acta.* 380(1-2):50-58. (2007).

Marin J. M., Carrizo S. J., Vicente E., & Agusti A. G. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *Lancet*. 365(9464):1046-1053. (2005).

Markwell M. A., Haas S. M., Bieber L. L., & Tolbert N. E. A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem*. 87:206-210. (1978).

Martínez-García M.A., Durán-Cantolla J., & Montserrat J.M. Sleep apnea syndrome in the elderly. *Arch. Bronconeumol*. 46:479-88. (2010).

Mehra R., Storfer-Isser A., Kirchner H. L., Johnson N., Jenny N., Tracy R. P., & Redline S. Soluble interleukin 6 receptor: A novel marker of moderate to severe sleep-related breathing disorder. *Arch. Intern. Med*. 166:1725-1731. (2006).

Moraes D. J., Da Silva M. P., Bonagamba L. G. H., Mecawi A. S., Zoccal D. B., Antunes-Rodrigues J., Varanda W. A., & Machado B. H. Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by the respiratory network in rats. *J. Neurosci*. 33(49):19223-19237. (2013).

Moraes D. J., Zoccal D. B., & Machado B. H. Medullary respiratory network drives sympathetic overactivity and hypertension in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Hypertension*. 60(6):1374-1380. (2012).

Morrison D. L., Launois S. H., Isono S., Feroah T. R., Whitelaw W. A., & Remmers J. E. Pharyngeal narrowing and closing pressures in patients with obstructive sleep apnea. *Am. Rev. Respir. Dis*. 148(3): 606-11. (1993).

Muller F. L., Liu Y. & Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem*. 279:49064-49073. (2004).

Nanduri J., Peng Y-J., Yuan G., Kumar G. K., & Prabhakar N. R. Hypoxia-inducible factors and hypertension: lessons from sleep apnea syndrome. *J. Mol. Med*. 93:473-480. (2015).

Nanduri J., Vaddi D.R., Khan S.A., Wang N., Makerenko V., & Prabhakar N.R. Xanthine oxidase mediates hypoxia-inducible factor-2alpha degradation by intermittent hypoxia. *PLoS One* 8:e75838. (2013).

Nanduri J., Wang N., Yuan G., Khan S. A., Souvannakitti D., Peng Y. J., Kumar G.K., Garcia J. A., & Prabhakar N. R. Intermittent hypoxia degrades HIF-2alpha via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106:1199–1204. (2009).

Narkiewicz K., Kato M., Phillips B. G., Pesek C. A., Davison D. E., & Somers V. K. Nocturnal continuous positive airway pressure decreases daytime sympathetic traffic in obstructive sleep apnea. *Circulation*. 100:1332-2335. (1999b).

Narkiewicz K., Somers V. K. The sympathetic nervous system and obstructive sleep apnea: Implications for hypertension. *J. Hypertens.* 15:1613-1619. (1997).

Narkiewicz K., van de Borne P. J., Pesek C. A., Dyken M. E., Montano N., & Somers V. K. Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea. *Circulation*. 99:1183–1189. (1999a).

Neubauer J. A. Invited review: physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 90:1593-1599. (2001).

Nieto F. J., Young T. B., Lind B. K., Shahar E., Samet J. M., & Redline S. Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. *Sleep Heart Health Study. JAMA.* 283(14):1829-1836. (2000).

Niki E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic. Biol. Med.* 47(5):469-84. (2009).

Ohike Y., Kozaki K., Iijima K., Eto M., Kojima T., Ohga E., Santa T., Imai K., Hashimoto M., Yoshizumi M., & Ouchi Y. 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.* 69:221-226. (2005).

Olea E., Agapito M.T., Gallego-Martin T., Rocher A., Gomez-Niño A., Obeso A., Gonzalez C., & Yubero S. Intermittent hypoxia and diet-induced obesity: effects on oxidative status, sympathetic tone, plasma glucose and insulin levels, and arterial pressure. *J. Appl. Physiol.* (1985). 117(7):706-19. (2014).

Ortiz F.C., del Rio R., Varas R., & Iturriaga R. Contribution of TASK-like potassium channels to the enhanced rat carotid body responsiveness to hypoxia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 758:365–371. (2012).

Pack A. Advances in sleep-disordered breathing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173: 7-15. (2006).

Pagel J.F. Obstructive sleep apnea (OSA) in primary care: evidence-based practice. *J. Am. Board Fam. Med.* 20:392-398. (2007).

Paglia D. E., & Valentine W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70(1): 158-169. (1967).

Parati G., Lombardi C., & Narkiewicz K. Sleep apnea: epidemiology, pathophysiology, and relation to vascular risk. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293: 1671-1683. (2007).

Pecqueur C., Alves-Guerra M. C., Gelly C., Levi-Meyrueis C., Couplan E., Collins S., Ricquier D., Bouillaud F., & Miroux B. Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation. *J. Biol. Chem.* 276 (12): 8705-12. (2001).

Peng Y. J. & Prabhakar NR. Effect of two paradigms of chronic intermittent hypoxia on carotid body sensory activity. *J. Appl. Physiol.* 96:1236–1242. (2004).

Peng Y. J., Nanduri J., Raghuraman G., Wang N., Kumar G. K., & Prabhakar N.R. Role of oxidative stress induced endothelin-converting enzyme activity in the alteration of carotid body function by chronic intermittent hypoxia. *Exp. Physiol.* 98(11): 1620-1630 (2013).

Peng Y. J., Nanduri J., Yuang G., Wang N., Deneris E., Pendyala S., Natarajan V., Kumar G. K., & Prabhakar N. R. NADPH oxidase is required for the sensory plasticity of the carotid body by chronic intermittent hypoxia. *J. Neurosci.* 29:4903-4910. (2009).

Peng Y. J., Nanduri J., Zhang X., Wang N., Raghuraman G., Seagard J., Kumar G. K., & Prabhakar N. R. Endotelin-1 mediates attenuated carotid baroreceptor activity by intermittent hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 112:187-196. (2012).

Peng Y. J., Overholt J.L., Kline D. D., Kumar G. K., & Prabhakar N. R. Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100:10073–10078. (2003).

Peng Y. J., Yuan G., Khan S., Nanduri J., Makarenko V. V., Reddy V. D., Vasavda C., Kumar G. K., Semenza G. L., & Prabhakar N.R. Regulation of hypoxia-inducible factor- α isoforms and redox state by carotid body neural activity in rats. *J. Physiol.* 592:3841–3858. (2014).

Peng Y. J., Yuan G., Ramakrishnan D., Sharma S. D., Bosch-Marce M., Kumar G. K., Semenza G. L., & Prabhakar N. R. Heterozygous HIF-1 alpha deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J. Physiol.* 577:705-716. (2006).

Peppard P., Young T., Palta M. & Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N. Engl. J. Med.* 342:1378-84. (2000).

Petersen S. V., Oury T.D., Ostergaard L., Valnickova Z., Wegrzyn J., Thøgersen I. B., Jacobsen C., Bowler R. P., Fattman C. L., Crapo J. D., & Enghild J.J. Extracellular Superoxide Dismutase (EC-SOD) Binds to Type I Collagen and Protects Against Oxidative Fragmentation. *J. Biol. Chem.* 279(14):13705-13710. (2004).

Prabhakar N. R. Sensing hypoxia: physiology, genetics and epigenetics. *J. Physiol.* 591:2245–2257. (2013).

Prabhakar N. R., & Semenza G. L. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiol. Rev.* 92:967-1003. (2012).

Prabhakar N. R., Kumar G. K., & Peng Y. J. Sympatho-adrenal activation by chronic intermittent hypoxia. *J. Appl. Physiol.* (1985). 113(8):1304-1310. (2012).

Prabhakar N. R., Kumar G. K., Nanduri J., & Semenza G. L. ROS signaling in systemic and cellular responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid. Redox Signal.* 9:1397–1403. (2007).

Prabhakar N.R., & Kumar G.K. Mechanisms of sympathetic activation and blood pressure elevation by intermittent hypoxia. *Respiratory Physiology & Neurobiology.* 156-161. (2010).

Prabhakar N.R., Dick T. E., Nanduri J., & Kumar G.K. Systemic, cellular and molecular analysis of chemoreflex-mediated sympathoexcitation by chronic intermittent hypoxia. *Exp. Physiol.* 92.1 pp 39–44. (2006).

Prabhakar N.R., Peng Y. J., Jacono F. J., Kumar G. K., & Dick T.E. Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 32:447–449. (2005).

Prabhakar N.R., Peng Y. J., Kumar G. K., & Nanduri J. Peripheral chemoreception and Arterial Pressure Responses to Intermittent Hypoxia. *Compr. Physiol.* Apr; 5(2):561-77. (2015).

Punchard N. A., & Kelly F. J. *Free Radicals. A Practical Approach.* IRL Press-Oxford University Press, Oxford, UK. Pp 1-8. (1996).

Raggi M. A., 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. Appl.* 730:201-211. (1999).

Rey S., Corthorn J., Chacon 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.* 55:167–174. (2007).

Rey S., del Rio R., Alcajaga J. & Iturriaga R. Chronic intermittent hypoxia enhances cat chemosensory and ventilator responses to hypoxia. *J. Physiol.* 560:577–586. (2004).

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.* 605:228–232. (2008).

Ribeiro M. J., Sacramento J. F., Gonzalez C., Guarino M. P., Monteiro E. C., & Conde S. V. Carotid body denervation prevents the development of insulin resistance and hypertension induced by hypercaloric diets. *Diabetes.* 62(8):2905-16. (2013).

Rio del R., Moya E. A., & 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.* 1395:74–85. (2011).

Roux J.C., Brismar H., Aperia A., & Lagercrantz H. Developmental changes in HIF transcription factor in carotid body: relevance for O₂ sensing by chemoreceptors. *Pediatr. Res.* 58:53–57. (2005).

Ryan C. M., & Bradley T. D. Pathogenesis of obstructive sleep apnea. *J. Appl. Physiol.* 99:2440-2450. (2005).

Safar M. E., Lange C., Blacher J., Eschwege E., Tichet J., & Balkau B; DESIR Study Group. Mean and yearly changes in blood pressure with age in the metabolic syndrome: the DESIR Study. *Hypertens. Res.* 34(1):91-97. (2011).

Saunamäki T., & Jehkonen M. Depression and anxiety in obstructive sleep apnea syndrome: a review. *Acta Neurol. Scand.* 16:277-88. (2007).

Schafer F. Q., & Buettner G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* 30:1191-1212. (2001).

Schmidt C. F. Respiration. In Bard P, ed. *McLeod's physiology in modern medicine* (8th ed.). St Louis: Mosby. p. 469-619. (1938).

Schumacker P. T. Lung cell hypoxia: role of mitochondrial reactive oxygen species signaling in triggering responses. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 8:477-484. (2011).

Scortegagna M., Ding K., Oktay Y., Gaur A., Thurmond F., Yan L.J., Marck B.T., Matsumoto A.M., Shelton J.M., Richardson J.A., Bennett M. J., & Garcia J. A. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nat. Genet.* 35:331–340. (2003).

Semenza G. L. Hypoxia-Inducible factors in physiology and medicine. *Cell.* 148:399-408. (2012).

Silva A. Q., & Schreihofner A. M. Altered sympathetic reflexes and vascular reactivity in rats after exposure to chronic intermittent hypoxia. *J. Physiol.* 589:1463-1476. (2011).

Sinha N., & Dabla P. K. Oxidative Stress and Antioxidants in Hypertension-A Current Review. *Curr. Hypertens. Rev.* 11 (2):132-42. (2015)

Socha M. J., Boerman E. M., Behringer E. J., Shaw R. L., Domeier T. L., & Segal S. S. Advanced age protects microvascular endothelium from aberrant Ca²⁺ influx and cell death induced by hydrogen peroxide. *J. Physiol.* (17 Feb.2015). doi: 10.1113/JP270169. [Epub ahead of print]. (2015).

Soltis E. E. Effect of age on blood pressure and membrane-dependent vascular responses in the rat. *Circ. Res.* 61(6):889-897. (1987).

Somers V. K., Dyken M. E., Clary M. P., & Abboud F. M. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea. *J. Clin. Invest.* Oct; 96 (4):1897-904. (1995).

Somoza M., Monasterio C., Campos-rodriguez F., & Lloberes P. Síndrome de apneas durante el sueño y su tratamiento. In *Patología básica del sueño*. Cap 6:83-111. (2015).

Souvannakitti D., Nanduri J., Yuan G., Kumar G. K., Fox A. P., & Prabhakar N. R. NADPH oxidase-dependent regulation of T-type Ca²⁺ channels and ryanodine receptors mediate the augmented exocytosis of catecholamines from intermittent Hypoxia-treated neonatal rat chromaffin cells. *J. Neurosci.* 30:10763–10772. (2010).

Sturtz L. A., Diekert K., Jensen L.T., Lill R., & Culotta V.C. A fraction of yeast Cu, Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J. Biol. Chem.* 276:38084-38089. (2001).

Taylor C. T., & Moncada S. Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30:643-647. (2010).

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.* 340:847-51. (1999).

Tsai Y. J., Ramar K., Liang Y. J., Chiu P. H., Powell N., Chi C. H., Lung T. C., Wen-Yang Lin W., Tseng P. J., Wu M. Y., Chien K. C., Weaver E. M., Lee F. P., Lin C. M., Chen K. C., & Chian R. P. Peripheral neuropathology of the upper airway in obstructive sleep apnea syndrome. *Sleep. Med. Rev.* 17:161-168. (2013).

Turrens J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552:335-344. (2003).

Uno K., & Nicholls S. J. Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis. *Biomark. Med.* 4:361–373. (2010).

Vgontzas A.N., Bixler E.O., & Chrousos G.P. Sleep apnea is a manifestation of the metabolic syndrome. *Sleep Med. Rev.* 9:211-24. 38. (2005).

Wang Z. Z., Dinger B. G., Stensaas L. J., & Fidone S. J. The role of nitric oxide in carotid chemoreception. *Biol. Signals.* 4:109-116. (1995).

Waypa G. B., & Schumacker P. T. Oxygen sensing in hypoxic pulmonary vasoconstriction: using new tools to answer an age-old question. *Exp. Physiol.* 93:133-138. (2008).

Wills A.K., Lawlor D.A., Matthews F.E., Sayer A.A., Bakra E., Ben-Shlomo Y., Benzeval M., Brunner E., Cooper R., Kivimaki M., Kuh D., Muniz-Terrera G., & Hardy R. Life course trajectories of systolic blood pressure using longitudinal data from eight UK cohorts. *PLoS Med.* 2011 Jun; 8 (6):e1000440. (2011).

Xing T., & Pilowsky P. M. Acute intermittent hypoxia in rat in vivo elicits a robust increase in tonic sympathetic nerve activity that is independent of respiratory drive. *J. Physiol.* 588:3075-3088. (2010).

Yamakura F., & Kawasaki H. Post-translational modifications of superoxide dismutase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1804:318-325. (2010).

Yan L. J., Levine R. L., & Sohal R. S. Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (Oct 14, 1997). 94(21):11168-11172. Erratum in: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998 Feb 17; 95(4):1968. (1997).

Yokoe T., Minoguchi K., Matsuo H., Oda N., Minoguchi H., Yoshino G., Hirano T., & Adachi M. 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.* 107 pp. 1129–1134. (2003).

Young I. S. Measurement of total antioxidant capacity. *J. Clin. Pathol.* 54:339. (2001).

Young T., Peppard P., Palta M., Hla K. M., Finn L., & Morgan B. Population-based study of sleep-disordered breathing as a risk factor for hypertension. *Arch. Intern. Med.* 157(15):1746-1752. (1997).

Young T., Peppard P.E., & Gottlieb D.J. Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165(9):1217-1239. (2002a).

Young T., Shahar E., Nieto F. J., Redline S., Newman A. B., Gottlieb D. J., Walsleben J.A., Finn L., Enright P., & Samet J.M.; Sleep Heart Health Study Research Group. Predictors of sleep-disordered breathing in community-dwelling adults: the Sleep Heart Health Study. *Arch. Intern. Med.* 162(8):893-900. (2002b).

Zhang W. & Mifflin S. W. Excitatory amino acid receptors within NTS mediate arterial chemoreceptor reflexes in rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 265:H770–H773. (1993).

Zhang W. Z., Venardos K., Finch S., & Kaye D. M. Detrimental effect of oxidized LDL on endothelial arginine metabolism and transportation. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40:920-928. (2008).

Zoccal D. B., Bonagamba L. G., Oliveira F. R., Antunes-Rodrigues J., & Machado B. H. Increased sympathetic activity in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Exp. Physiol.* 92:79-85. (2007).

Zoccal D. B., Simms A. E., Bonagamba L. G., Braga V. A., Pickering A. E., Paton J. F., & Machado B. H. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J. Physiol.* 586:3253-3265. (2008).