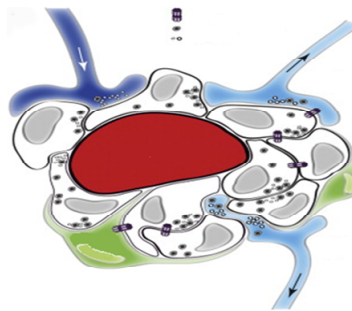




Tesis Doctoral

**HIPEROXIA PERINATAL E HIPOXIA CRÓNICA COMO
MODELOS EXPERIMENTALES PARA EL ESTUDIO DE LA
TRANSDUCCIÓN HIPÓXICA**



María Ramírez Arroyo

Directores:

Dra. Asunción Rocher Martín

Dr. Constancio González Martínez

Facultad de Medicina

Valladolid, 2014

A mis padres

A Violeta

Y muy especialmente a Víctor

"Grito alto,
quiero acariciar estrellas con tus ojos: Alma.

Aurora bondadosa,
dame la luz de tus respaldos y riberas,
la dulce eternidad de tus caderas.

Admiro, tiemblo, quiebro a cada paso
y me dejo zozobrar por las quimeras
de una tierra que a las ocho virgen se sueña.

Me gusta ser por sorpresa un cielo limpio,
y lloviznar con amapolas cariñosas
sobre las mesas de papel y las aceras,
sobre la triste enredadera.

Cantar es mi corazón de trigo
que a veces está perdido
y en otras verde o tostado
o simplemente abandonado.

Y soy tan tuya como de todos
como del horizonte, del infinito,
tan tremendamente limpia como la noche,
como la nada,
como las botas mojadas pretendiendo ser barquitos.

Y soy un grito"

"Sólo aquel que ha estado en lo más profundo de los valles puede entender lo que es
estar en la cumbre de las más alta montaña"

Richard Nixon

"La suerte pertenece a los que tienen coraje"

Agradecimientos

Este trabajo no habría podido ser realizado sin la inestimable ayuda de muchas personas que han contribuido a que llegue a término, por ello quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Prof. Constancio González, director de mi Tesis junto con la Dra. Asunción Rocher, por su guía, buena orientación y su excelencia como investigador científico.

A la Dra. Asunción Rocher, primero por su papel como codirectora de mi Tesis, por su gran dedicación, esfuerzo y supervisión durante estos años y en segundo lugar como amiga, por su apoyo incondicional y su cariño en buenos y malos momentos. ¡Muchas gracias Asun!

A la Dra. Ángela Gómez-Niño y Ana Obeso por su cercanía y su trato amable en momentos donde una sonrisa vale más que mil palabras.

A la Dra. María Teresa Agapito por enseñarme una gran parte de los conocimientos técnicos que ahora poseo y por compartir conmigo experiencias íntimas e inolvidables. ¡Muchas gracias Tere!

Al Dr. Javier Castañeda, por su trabajo con los experimentos de hiperoxia, el interés mostrado y su buen trato.

A Josefina, a Jesús, a Silvia, a Mari Carmen y a Alfredo, a Rosalba, a Maite y a Javier, por los buenos ratitos compartidos.

A Irene y a German, por su amabilidad y porque su presencia en el Departamento ha sido un soplo de aire fresco para todos.

A Ana Gordillo, por su amistad y su bondad, a Sara Yubero, por su apoyo y su sonrisa, a Teresa Gallego, por las pequeñas charlitas y a Pili por su trato amable y sus ánimos.

A Dani, por su gran ayuda con la informática, su buen humor y su amistad.

A mis chicas: María Llanos, Elena Olea, Elena González, Mamen y Marita, que me han ayudado a poder superar esta etapa y que han sido para mí claves en mi vida. ¡Os quiero chicas!

A Jesús Prieto, por su gran amistad y la confianza depositada en mí.

A los miembros del animalario: Ángel, Juanjo y Félix, que se han convertido en grandes amigos y me han hecho sentir como en casa.

A Olimpio Montero, Alberto Sánchez y David Balgoma, por todo lo aprendido con el espectrómetro de masas y por su amistad.

A todos los miembros del Departamento, tanto los del IBGM como de la Facultad. En especial a Espe, Pili, Edu, Sendoa, Christian, Álex, Olaia, Silvia, Jaime, Laura, Silvia Conde, Eva, Sarita, Joserra y Tere, que han sido mis amigos y compañeros en este largo viaje.

A mi mejor amiga, Vanessa, que siempre está a mi lado y me apoya en todo.

A mis amigos de ahora y de siempre: Rafa, Álex, Loren, Esther, Pilar, Sara, Diego, Patri, Yoli, Pili... que me animan y me cuidan.

A mi familia, mis tíos, mis primas, mi querida abuela, que siempre están ahí para mí y que me han enseñado lo que es el calor del hogar. ¡Muchas gracias!

A mis padres, por haberme dado todo lo que ha estado en sus manos y quererme sin condiciones, sin ellos no sería la persona que soy ahora. Les debo todo. ¡Os quiero!

A Violeta, mi querida hermana, que me ha enseñado a ser valiente y que es una de las personas más importantes de mi vida.

A Víctor, mi chico, por enseñarme lo que es el amor y como aprender a ser libre, compartiendo conmigo las penas y alegrías de esta Tesis. ¡Sin ti no habría podido hacerla! ¡Te quiero! Gracias de todo corazón.

Y por último quiero darle las gracias a Dios, por darme salud y fuerza para terminar con este capítulo de mi vida y hacerme consciente de lo que significa luchar por un sueño. ¡Gracias!

¡Gracias a todos!

Índice

	Página
ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN:	5
1. Aspectos generales: Hipoxia y sistemas de defensa	5
1.1 Vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH)	7
1.2 Hiperventilación refleja	7
1.3 Respuesta de las células productoras de EPO	9
2. Circulación pulmonar: consideraciones generales	11
3. Comportamiento de los vasos pulmonares frente a la hipoxia: VPH	15
3.1 Descubrimiento y significado de la VPH	15
3.2 Mecanismos de la VPH	19
3.2.1 Hipótesis Redox	23
3.2.2 Hipótesis de las especies reactivas de O₂ (ROS)	24
3.2.3 Hipótesis del estado energético-AMPK	26
4. Hiperoxia perinatal y VPH	30
5. Estructura del CC	32
5.1 Anatomía	32
5.2 Ultraestructura y neuroquímica	34
5.3 Neurotransmisión en el CC	34
6. Función del CC	37
6.1 Respuesta frente a normoxia e hipoxia hipóxica	37
6.2 Respuesta frente a hipoxia anémica, histotóxica y de estasis	39
6.3 Respuesta frente a hipercapnia y acidosis	40
6.4 Respuesta frente al ejercicio	41
6.5 Respuesta frente a otros factores (Temperatura, Osmolaridad y Glucosa)	42
6.6 Ajustes del CC con la edad	43
6.7 Ajustes del CC con la hipoxia sostenida	44
7. Mecanismos celulares del CC	45
7.1 Hipoxia hipóxica	47
7.1.1 Sensor(es) de O₂	48
7.1.1.2 Sensores de O₂ bioenergéticos	49
7.1.1.3 Sensores de O₂ biosintéticos	51
7.1.1.4 Sensores de O₂ conformacionales	57
7.2 Acidosis-Hipercapnia	62

8. Segundos mensajeros y función de las CQ	64
8.1 Papel de los gasotransmisores en la detección hipóxica por el CC	64
8.1.1 Gasotransmisores inhibitorios	65
8.1.2 Excitación sensorial por la hipoxia: un papel para el H ₂ S	65
9. Papel del AMP _c en la transducción sensorial	67
9.1 Papel del AMP _c en el CC	73
OBJETIVOS	79
MATERIAL Y MÉTODOS:	81
1. Animales de experimentación	81
1.1 Consideraciones generales	81
1.2 Tratamientos experimentales	81
1.2.1 Hiperoxia perinatal	81
1.2.2 Hipoxia crónica	83
1.2.3 Hipoxia intermitente	83
1.3 Procedimientos quirúrgicos	85
2. Pletismografía de cuerpo completo	86
3. Registro de presión arterial sistémica (PAS) y presión en arteria pulmonar (PAP)	87
4. Estudios electrofisiológicos	88
5. Determinación de ácido lipoico, Trolox metil éter y tocoferoles en plasma mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas con detección por trampa iónica (HPLC-ESI-MS/MS)	89
6. Parámetros relacionados con el estado redox en diferentes tejidos:	93
6.1 Determinación de la actividad enzimática de la GPx	93
6.2 Valoración de glutatión y glutatión oxidado	94
7. Western Blot	96
8. Inmunocitoquímica	98
9. Medida de la respuesta secretora del CC	100
10. Medida de AMP _c	102
11. Métodos estadísticos y presentación de datos	104
RESULTADOS:	105
1. Efectos de la hiperoxia perinatal sobre la respuesta a la hipoxia aguda del CC y de la circulación pulmonar	105
2. Efectos de la hiperoxia perinatal sobre algunos parámetros relacionados con el estado redox en tejidos	109

3. Hiperoxia perinatal y estado redox en tejidos: efectos de una dieta suplementada con antioxidantes	112
4. Hiperoxia perinatal: efectos de una dieta suplementada con antioxidantes sobre la respuesta a la hipoxia aguda del CC y de la circulación pulmonar	116
5. Propiedades electrofisiológicas de las células musculares lisas aisladas de arteria pulmonar de animales controles e hiperóxicos perinatales	119
6. Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta adaptativa del CC a la hipoxia crónica	122
6.1 Parámetros ventilatorios medidos por pletismografía en animal	123
6.2 Participación de los canales de Ca ²⁺ en la remodelación sufrida por exposición a hipoxia crónica	124
6.3 Papel del AMPc en el CC de ratas hipóxicas	127
6.3.1 Efecto de la hipoxia aguda sobre los niveles de AMPc en CC de ratas mantenidas en hipoxia crónica sostenida e intermitente	128
6.3.2 Efecto del pH /bicarbonato sobre los niveles de AMPc en el CC de rata	130
6.3.3 Participación de la adenilato ciclasa en la activación del CC por diferentes estímulos: medida de la respuesta secretora	131
6.3.4 Participación de la PKA en la activación del CC por la hipoxia aguda: medida de la respuesta secretora	133
6.3.5 Participación de la proteína Epac en la activación del CC por la hipoxia aguda	136
6.4 Análisis de la expresión de Epac mediante Western Blot	138
6.5 Localización de Epac mediante Inmunocitoquímica	139
6.6 Efecto de inhibidores específicos de Epac 1 y Epac 2 sobre la respuesta del CC a la hipoxia	141
6.7 Efecto de inhibidores específicos de AC y de Epac sobre la respuesta del CC a la acidosis hipercápnica en normoxia e hipoxia crónica	144
6.8 Estudio de la potenciación de la respuesta del CC a la hipoxia y acidosis hipercápnica en el CC	148
6.9 Participación de AMPc y Epac en la potenciación de la respuesta del CC a la hipoxia y acidosis hipercápnica	150
DISCUSIÓN:	153
1. Efectos de la hiperoxia perinatal	153

2. Efectos de la hipoxia crónica	162
3. Aspectos generales: una visión integrada	179
CONCLUSIONES	183
BIBLIOGRAFÍA	185

Abreviaturas

AC	Adenilato ciclasa
ACtm	Adenilato ciclasa transmembrana
ACs	Adenilato ciclasa soluble
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ACh	Acetilcolina
ADH	Hormona antidiurética
ADHL	Ácido dihidrolipoico
ADPRc	ADP- ribosa cíclica
AGI	Ácidos grasos poliinsaturados
AICAR	5-aminoimidazol-4-carboxamida ribósido
AKAP	Proteína de anclaje de proteína quinasa A
AL	Ácido lipoico
AMPc	3-5' adenosina monofosfato cíclico
AMPK	Quinasa dependiente de AMP
AP	Arteria pulmonar
2-APB	2-Aminooxidifenil borato
ASIC	Canales aniónicos sensibles a ácido
ASS	Ácido 5-sulfosalicílico
BFA	Brefeldina A
CA	Catecolaminas
cAMP-GEF	Factores de intercambio de nucleótidos de guanina activados por AMPc
CaO ₂	Contenido de oxígeno arterial
CBS	Cistationina β sintasa
CC	Cuerpo carotídeo
CICR	Liberación de calcio inducida por calcio
Cm	Capacitancia
CMLAP	Células de músculo liso de arteria pulmonar
CQ	Células quimiorreceptoras
CQCC	Células quimiorreceptoras del cuerpo carotídeo
CRF	Capacidad residual funcional
CSE	Cistationina γ liasa
CTX	Toxina colérica
CvO ₂	Contenido venoso de oxígeno
D2	Receptores de dopamina tipo II
DA	Dopamina
DHE	Dihidroetidina
DPI	Difenileidonio
DTNB	5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
E _{GSH}	Potencial redox del par glutatión
E _m	Potencial de membrana
Epac	Factores de intercambio de nucleótidos cíclicos activados por AMPc
EPO	Eritropoyetina
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
ERK	Proteína quinasa regulada por señales extracelulares
ESCA	Análogo de AMPc selectivo de Epac
ESI	Ionización por electro spray

ESI-05	4- Metilfenil- 2, 4, 6- trimetilfenilsulfona
ESI-09	3- [5- (tert.- Butil)isoxazol- 3- il]- 2- [2- (3- clorofenil)hidrazono]- 3- oxopropanonitrilo
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster
FSK	Forskolina
GAP	Proteínas activadoras de las GTPasas
GCS	Ganglio cervical superior
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GST	Glutación total
GTPasa	Proteína guanósina trifosfatasa
5-HT	Serotonina
Hb	Hemoglobina
HC	Hipoxia crónica
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico
HI	Hipoxia intermitente
HIF	Factor inducible por hipoxia
HJC0197	4- Ciclopentil- 2- (2, 5- dimetilbencilsulfanil)- 6- oxo- 1, 6- dihidropirimidina- 5- carbonitrilo
HO	Hemo oxigenasa
HRP	Peroxidasa de rábano
HS	Hiperoxia suplementada
IBMX	Isobutilmetilxantina
KO	<i>Knockout</i>
mAKAP	Proteína de anclaje de proteína quinasa A de músculo
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MRM	Modo de reacción múltiple monitorizada en espectrometría de masas
MS	Espectrometría de masas
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NE	Norepinefrina
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	NADPH oxidasa
NSC	Nervio del seno carotídeo
NT	Neurotransmisor
P _A	Presión alveolar
Pa	Presión arterial
PA	Potencial de acción
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAP	Presión en arteria pulmonar
PAS	Presión arterial sistémica
PB	Presión barométrica
PBS	<i>Buffer</i> salino fosfato

PCA	Ácido perclórico
PDE	Fosfodiesterasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PKG	Proteína quinasa G
PMC-6	1R,4R-3-(6-aminopurin-9-il) ácido ciclopentano carboxílico hidroxiamida
PNs	Neuronas del ganglio petroso
Po	Probabilidad de apertura
PP2A	Proteína fosfatasa 2A
PPi	Pirofosfato inorgánico
PTX	Toxina pertússica
Pv	Presión venosa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
R	Recuperación
RGS	Proteínas reguladoras de la señalización por proteínas G
RNAi	RNA de interferencia
RNAm	RNA mensajero
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
RVP	Resistencia vascular pulmonar
RVS	Resistencia vascular sistémica
RyR	Receptores de rianodina
SB	Tampón de carga
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de la media
SOCC	Canales de Ca ²⁺ operados por depósito
SOD	Superóxido dismutasa
SSF	Suero salino fisiológico
STIM 1	Molécula 1 de interacción con el estroma
SUR1	Receptor 1 de sulfonil urea
TBS-T	<i>buffer</i> Tris salino- <i>Tween</i> 20
TCA	Ácido tricloroacético
TEA	Tetraetilamonio
TH	Tirosina hidroxilasa
TME	Trolox metil éter
TNB	5-tio-2-nitrobenzoico
TNF α	Factor de necrosis tumoral
Ts	Tocoferoles
TTX	Tetrodotoxina
V/Q	Cociente ventilación-perfusión
VOCC	Canales de Ca ²⁺ voltaje dependientes
VPH	Vasoconstricción pulmonar hipóxica

Introducción

1. ASPECTOS GENERALES: HIPOXIA Y SISTEMAS DE DEFENSA

El O_2 , por medio de la respiración celular, es utilizado en las células para oxidar los nutrientes y obtener la energía necesaria para todas sus funciones, dando CO_2 y H_2O como principales productos de desecho. El aporte de O_2 desde la atmósfera a las células es llevado a cabo por los aparatos respiratorio (o ventilatorio) y circulatorio. En conjunto este proceso conlleva el bombeo del aire rico en O_2 desde la atmósfera a los alvéolos, donde se produce la difusión del O_2 a la sangre y su unión a la hemoglobina (Hb), transportándose de este modo a todos los capilares sistémicos del organismo. La disociación del O_2 unido a la Hb y su difusión al medio interno permite su acceso al interior de las células y a las mitocondrias, donde se oxidan los nutrientes. Igual camino, pero en sentido inverso, sigue el CO_2 desde las mitocondrias a la atmósfera.

Siempre que el aporte de O_2 a las células sea insuficiente para que éstas puedan desarrollar con normalidad sus funciones nos encontraremos en una situación de hipoxia. Esta puede ser de diferentes tipos, dependiendo de si se produce por un aprovisionamiento inadecuado de O_2 a la sangre (hipoxia hipóxica), de una disminución de la capacidad de la sangre de unir o desprender el O_2 (hipoxia anémica), de un enlentecimiento en la velocidad de circulación de la sangre (hipoxia de estasis) o de una incapacidad de las células para utilizar el O_2 (hipoxia histotóxica). Fisiológicamente en un animal sano sólo es posible la hipoxia hipóxica, que resulta de una disminución de la presión de oxígeno (PO_2) en el aire inspirado debido a las grandes alturas, **a esta hipoxia la llamaremos hipoxia fisiológica**. El resto de las hipoxias serán patológicas.

Los animales superiores disponen de mecanismos reguladores que, al actuar sobre los aparatos respiratorio y circulatorio, tienden a prevenir o minimizar la hipoxia y en el estado adulto existen tres sistemas responsables de estas respuestas tal y como se describe en la **Figura 1**:

Las células musculares lisas de las arterias pulmonares (CMLAP), que detectan la caída de la PO_2 y se contraen en respuesta a la hipoxia alveolar redirigiendo la sangre hacia zonas pulmonares bien ventiladas para mejorar la oxigenación de la sangre a nivel pulmonar y la relación ventilación-perfusión

(V/Q) denominándose a esta respuesta vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH) (Marshall et al., 1994).

Las células quimiorreceptoras del cuerpo carotídeo (CQCC) y en menor grado los cuerpos aórticos, detectan la PO_2 arterial y en respuesta a la hipoxia en sangre arterial se activan generando respuestas reflejas, con el aparato respiratorio y circulatorio como principales efectores, para aumentar el bombeo de aire a los pulmones (hiperventilación) y de sangre a los tejidos, y así tratar de conseguir restablecer los parámetros a la normalidad. Asimismo el CC realiza una función homeostática en relación al pH del medio interno, cooperando con los quimiorreceptores centrales (González et al., 1994).

Las células productoras de Eritropoyetina (EPO), que detectan la hipoxia sistémica y responden produciendo un aumento de EPO, activando la eritropoyesis y aumentando la capacidad de la sangre para transportar O_2 (Jelkmann, 1992).

SENSIBILIDAD A LA HIPOXIA FISIOLÓGICA

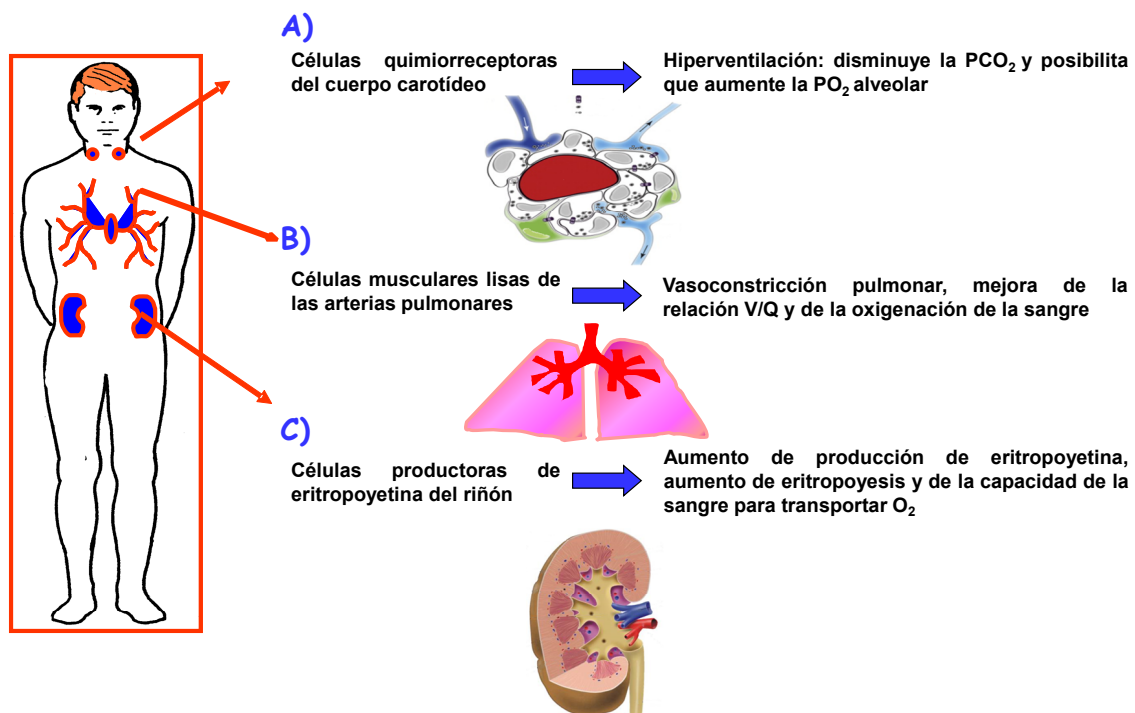


Figura 1. Células especializadas con sensibilidad a la hipoxia fisiológica: A) CQCC que detectan la PO_2 arterial y desencadenan una hiperventilación refleja encaminada a mejorar la PO_2 alveolar; B) CMLAP que desencadenan la VPH redirigiendo la sangre hacia zonas mejor ventiladas con el consiguiente ajuste de la V/Q; C) Células productoras de EPO en el riñón que aumentan el número de hematíes en respuesta a la hipoxia y con ello la capacidad de transporte de O_2 por la sangre. (Modificada de González et al., 2010).

También existen células con sensibilidad a la hipoxia fisiológica en el estado fetal, como las células cromafines de médula adrenal, que pierden tempranamente su sensibilidad a la hipoxia en el período postnatal cuando la médula adrenal es innervada por los nervios esplácnicos (Rico et al., 2005; Seidler y Slotkin, 1985). Igual les sucede a las células quimiorreceptoras (CQ) de los cuerpos pulmonares neuroepiteliales, que son sensibles al O₂ en animales neonatales y que se atrofian en el animal adulto (Peers y Kemp, 2001).

1.1 Vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH)

El carácter o significado adaptativo de la VPH generalizada típica de la hipoxia fisiológica es cuestionado. Sin embargo, se acepta sin reservas que durante la vida fetal la VPH juega un papel decisivo en la supervivencia del feto, ya que el alto nivel de resistencias en la circulación pulmonar fuerza a la sangre oxigenada proveniente de la placenta, mezclada con sangre venosa fundamentalmente de territorios drenados por la cava superior y que bombea al ventrículo derecho, a que se desvíe por el "*ductus arteriosus*" hacia la circulación sistémica. Es aceptado igualmente que la VPH regional que ocurre en múltiples patologías localizadas o que afectan incluso a uno de los pulmones completos juega un papel decisivo en la optimización de las relaciones V/Q del pulmón considerado como un todo. La VPH en los sectores pulmonares enfermos mal ventilados en los que la presión de oxígeno alveolar (P_AO₂) es baja, minimiza su perfusión y fuerza el flujo sanguíneo hacia las áreas pulmonares bien ventiladas para optimizar el intercambio gaseoso. Los intensivistas conocen muy bien que los potenciadores de la VPH tipo almitrina mejoran la presión de oxígeno arterial (PaO₂) en muchos cuadros clínicos con desequilibrios ventilatorios exagerados. Paradójicamente, la administración de óxido nítrico (NO) inhalado, que es un potente vasodilatador de la circulación pulmonar, también mejora la oxigenación de la sangre, ya que sólo accede a las zonas ventiladas produciendo vasodilatación y no actúa en las zonas patológicas no ventiladas.

1.2 Hiperventilación refleja

La hiperventilación fue apreciada como respuesta a la hipoxia fisiológica por los primeros fisiólogos-expedicionarios de grandes alturas, pero hasta Gay-Lussac no hubo constancia escrita de los síntomas sufridos en estas condiciones ambientales (7000 m). El fisiólogo alemán, F.W. Pflüger describió en 1868, la

hiperventilación producida al respirar N₂ puro y Boycott y Haldane en 1908 describieron en detalle los efectos ventilatorios de la hipoxia hipóxica de distintas intensidades como una hiperventilación con aumento de la frecuencia y profundidad de los movimientos respiratorios. En 1928, Fernando de Castro, discípulo de Cajal, descubrió que el CC que hasta entonces había sido considerado un ganglio simpático (*ganglium minutum*, *ganglium exiguum*) o una glándula (*glándula carotica*, *glándula intercarotica*), era en realidad un órgano sensorial inervado por un nervio sensorial, el nervio del seno carotídeo (NSC) o nervio de Hering, y no por un nervio secretomotor, advirtiendo la estrecha relación que existe entre las células epiteliales del CC (conocidas ahora como CQ o de tipo I) y los capilares sanguíneos así como con las terminaciones sensoriales. De Castro postuló que la función del CC sería la detección de los cambios en la composición de la sangre proponiendo que esta función era llevada a cabo por las CQ que actuaban como sensoras de la PO₂. En 1930, Corneille Heymans en Gante descubría que la hiperventilación que originaba la hipoxia era refleja y que el reflejo tenía su origen en el CC, hecho por el que recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1938.

En la actualidad se sabe que en los animales superiores, los quimiorreceptores arteriales en situaciones de disminución de la PO₂ o del contenido de O₂, generan respuestas reflejas aumentando el bombeo de aire a los pulmones y de sangre a los tejidos para tratar de mantener la homeostasis del organismo completo. Las CQCC se activan instantáneamente cuando disminuye la PaO₂ y aumentan la liberación de neurotransmisores (NT); éstos activan a las terminaciones sensoriales del NSC aumentando su frecuencia de descarga; estos impulsos activan al centro respiratorio y se produce un aumento proporcional de la ventilación pulmonar (**Figura 2**). Un aspecto muy importante de esta respuesta hiperventilatoria originada en el CC es su umbral. Cuando la PaO₂ es de en torno a 70 mmHg (equivalente a una presión barométrica (PB) de 600 mmHg y una altitud de 2.000 m), los CC comienzan a activarse y a aumentar ligeramente la ventilación. Si consideramos que a esa PaO₂ de 70 mmHg la saturación de la Hb es del 94%, resulta que el CC se anticipa a la hipoxia tisular, tratando de prevenirla. Otro hecho

que se aprecia en la figura es que a PaO₂ inferiores a 40-45 mmHg, disminuciones ligeras de la PaO₂ producen aumentos marcados de la ventilación.

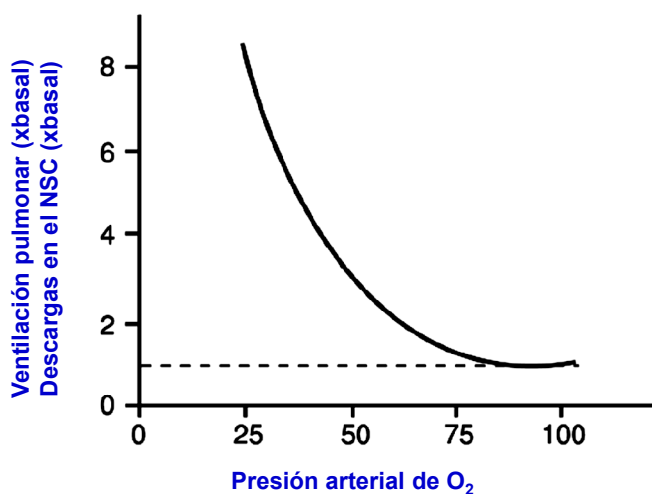


Figura 2. Relación entre la PaO₂ y la actividad en el NSC y la ventilación pulmonar. Nótese el umbral de ambas respuestas en torno a 75 mmHg y la subida exponencial de las mismas a medida que disminuye la PaO₂. La línea de puntos corresponde a la ventilación basal (5 l/min) a nivel del mar (PaO₂ = 100 mmHg) y la actividad basal (frecuencia de potenciales de acción (PA) en fibras únicas del NSC, 2 a 3 potenciales/s) a la misma PO₂. La ganancia máxima de ambas respuestas es próxima a 8 a 10 veces la basal. (Tomada de González, 2006).

1.3 Respuesta de las células productoras de EPO

La policitemia de grandes alturas es normocítica por lo que el aumento del número de hematíes produce un aumento proporcional de la [Hb]. Es evidente que un aumento de la [Hb], aun cuando la PaO₂ esté disminuida, aumenta el contenido de O₂ arterial (CaO₂). El umbral de hipoxia para la producción de EPO es comparable al descrito para la activación del CC, de forma que con PaO₂ = 70-75 mmHg (a ≈1.800-2.200 m sobre el nivel del mar) comienza a haber un aumento en la secreción de EPO. Dado que el aumento de la [Hb] producido por la hipoxia es aproximadamente proporcional a la disminución de la PaO₂, la cantidad de O₂ que transporta la sangre a distintas alturas se mantiene. En un sujeto normal a nivel del mar con una PaO₂ de 100 mmHg, el CaO₂ ligado a la Hb es de ≈ 189 ml de O₂/l de sangre (CaO₂ = 145 × 1,34 × 97,5/100 = 189 ml de O₂/l de sangre; 145 es la [Hb] en g/l; 1,34 es la capacidad máxima de la Hb para transportar O₂ en ml O₂/g de Hb; 97,5/100 es el % de saturación de la Hb a la PaO₂ normal de 100 mmHg). Pues bien, a 4.400 de altura sobre el nivel del mar según señalan Ward y cols. (1995), la [Hb] aumenta a 171 g/l y la PaO₂ cae a 47 mmHg con una saturación de la Hb del 82% lo

que nos proporcionaría una cantidad de O₂ ligado a la Hb de 188 ml de O₂/l de sangre. Lo mismo ocurre a 5.300 m, la eritropoyesis normocítica aumenta, con lo que la cantidad de O₂ que transporta la sangre sigue siendo la misma que a nivel del mar.

Sin embargo, no hay que olvidar que el parámetro importante para definir la hipoxia es la PO₂ tisular. Con consumos de O₂ normales (250 ml/min) y un gasto cardíaco normal de 5,5 l/min, sabemos que a nivel del mar la diferencia entre CaO₂ y el contenido venoso de O₂ (CvO₂), CaO₂ – CvO₂, es de en torno a 45 ml de O₂, que la saturación de la Hb en sangre venosa es próxima al 75% y que la presión venosa de O₂ (PvO₂) media es de 40 mmHg, y por tanto la PO₂ tisular media podría acercarse a 40 mmHg. A 4.400 m (asumiendo un consumo de O₂ y un gasto cardíaco idénticos) habríamos de tener la misma CaO₂ – CvO₂ de 45 ml de O₂ para satisfacer el consumo de O₂ corporal y dado que el CaO₂ es el mismo, 190 ml/l de sangre, el CvO₂ tiene que ser de 145 ml O₂/l de sangre. La saturación de la Hb en la sangre venosa a 4.400 m se calcula como: 145 ml O₂/l = 171 g de Hb/l x 1.34 ml O₂/l x % Saturación; lo que nos da una saturación del 63.3%. A esa saturación le corresponde una PO₂ de ≈ 34 mmHg que sería la PvO₂ media y la PO₂ tisular máxima esperada a 4.400 m.

Así pues, gracias a las respuestas adaptativas, la VPH, la hiperventilación y la policitemia, se consigue que la diferencia de 53 mmHg en la PaO₂ entre el nivel del mar y los 4.400 m, sea sólo de 6 mmHg a nivel de la PO₂ tisular.

Mi trabajo de Tesis Doctoral se va a centrar en dos de las tres estructuras con sensibilidad a la hipoxia fisiológica, los vasos pulmonares y el CC. Por ello pasaré a revisar con algún detalle la organización estructural y funcional de los mismos. En esta revisión voy a seguir el orden o secuencia temporal de la exposición y respuesta a la hipoxia. Las CMLAP, que detectan y responden fundamentalmente a la P_AO₂, son las primeras en luchar contra la hipoxia y unos segundos más tarde lo hacen las CQCC.

2. CIRCULACIÓN PULMONAR: CONSIDERACIONES GENERALES

El sistema vascular de distribución del flujo sanguíneo en los pulmones constituye o conforma la circulación pulmonar y es de gran importancia para el intercambio de gases y en último término para la respiración celular. La arteria pulmonar (AP), que sale del ventrículo derecho, se bifurca en dos arterias que irrigan cada uno de los pulmones y que se ramifican en arterias más pequeñas y arteriolas siguiendo las divisiones del árbol bronquial. La principal característica de estas AP es la delgadez de sus paredes y su alta distensibilidad en comparación con la de los vasos sistémicos. La presión en la arteria pulmonar (PAP) permanece baja y permite el intercambio de O_2 y CO_2 a través de dos finas capas de células que separan los capilares y los alvéolos: el endotelio capilar y el epitelio alveolar. Al mantenimiento de esta baja presión contribuye el endotelio vascular pulmonar y la producción de mediadores vasodilatadores. La disfunción del endotelio puede dar lugar a alteraciones del tono vascular pulmonar o hipertensión pulmonar.

En el hombre, durante la sístole, la PAP es de unos 25 mmHg, similar a la que se registra en el ventrículo derecho. Después del cierre de la válvula pulmonar, al final de la sístole-inicio de la diástole, la presión en el ventrículo cae bruscamente hasta 0-1 mmHg, mientras que la PAP lo hace lentamente al fluir la sangre a través de los capilares pulmonares, hasta un valor medio de presión arterial diastólica (Pa) de unos 8 mmHg. Toda esta secuencia origina una PAP media de ≈ 15 mmHg. En el hombre, el volumen de sangre que nos encontramos en los pulmones es alrededor de 600 ml, de los cuales unos 200 se encuentran en los capilares y el resto se distribuyen casi por igual entre arterias y venas. La pérdida de sangre de la circulación sistémica como consecuencia de una hemorragia, por ejemplo, puede compensarse, al menos en parte, por el desplazamiento de sangre de los vasos pulmonares a los sistémicos, pero dado que el volumen sanguíneo sistémico es unas 8-9 veces superior al volumen pulmonar, un desplazamiento de sangre de la circulación pulmonar a la sistémica posee un efecto compensatorio menor. En realidad es la venoconstricción de la circulación sistémica el mecanismo más importante de compensación ante una pérdida de sangre.

En los pulmones se pueden distinguir hasta 3 zonas con diferentes patrones de flujo sanguíneo. En una persona erguida existen en torno a 30 cm de distancia entre el extremo superior del pulmón (ápex pulmonar) y el extremo inferior (bases pulmonares), con la consiguiente diferencia de presión hidrostática entre los vasos de la parte superior y los de la inferior, que representa una diferencia de en torno a 23 mmHg, de los cuales 15 se encuentran por encima del corazón y 8 por debajo. Los capilares de las paredes alveolares están distendidos por la presión sanguínea de su interior y simultáneamente son comprimidos por la presión alveolar (P_A) exterior, por lo que cuando el valor de la P_A es mayor que la presión capilar los capilares se cierran y cesa el flujo sanguíneo (**Figura 3**).

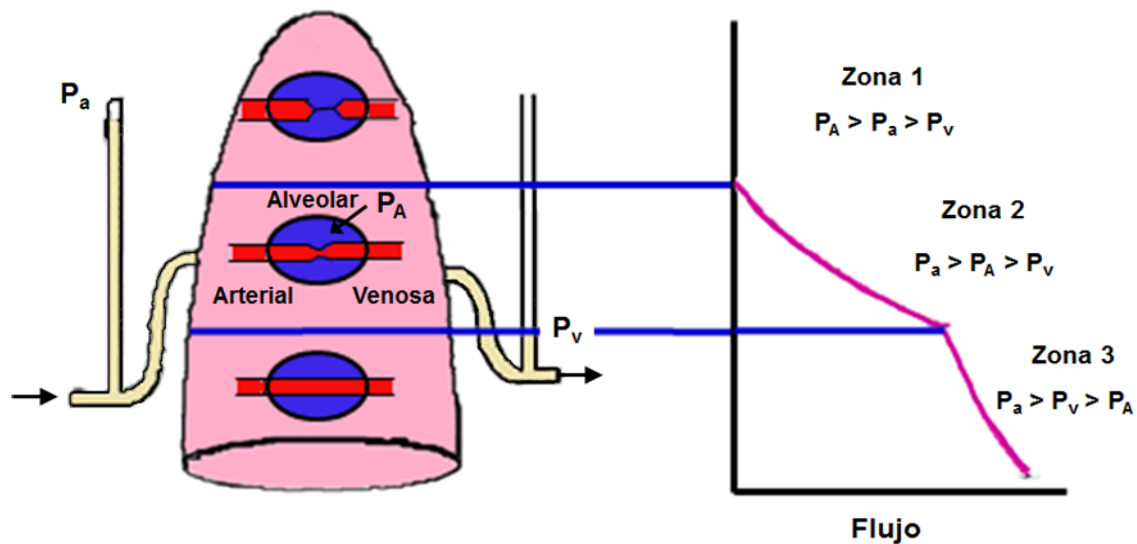


Figura 3. Modelo zonal para el flujo sanguíneo en el pulmón. El flujo es función de la altura vertical y dependiente de la relación entre presión alveolar y vascular. P_A , presión alveolar; P_a , presión arterial; P_v , presión venosa. (Tomado de Hlastala y Glenny, 1999).

Zona 1: Se caracteriza por ausencia de flujo sanguíneo en todos los momentos del ciclo cardíaco, puesto que la presión capilar nunca llega a superar la P_A local.

Zona 2: El flujo sanguíneo es intermitente, sucede sólo durante los momentos de máxima presión arterial, es decir, durante la sístole, cuando la presión arterial pulmonar es superior a la P_A .

Zona 3: El flujo sanguíneo es continuo pues la presión arterial y la presión capilar pulmonar son mayores que P_A durante todo el ciclo cardíaco.

Una vez producida la ventilación pulmonar y teniendo aire rico en O_2 en los alvéolos, el paso siguiente es la difusión del O_2 hacia la sangre y del CO_2 en dirección opuesta, aunque en realidad la difusión de gases es un proceso continuo. La presión parcial que ejerce cada gas en la mezcla de gas respiratorio alveolar fuerza a las moléculas a disolverse, primero en la membrana alveolar y luego en la sangre, ocurriendo lo mismo pero a la inversa con las moléculas de gas disueltas en la sangre. El grado de difusión neta está determinado por la diferencia entre las presiones parciales de cada uno de los gases entre los alvéolos y la sangre. En los líquidos, cuando hablamos de la tasa de difusión de gases, hay que considerar además de la diferencia de presión, otros factores como pueden ser: la solubilidad del gas en el líquido, el área transversal del líquido, la distancia a recorrer, el peso molecular del gas y la T^a del líquido. Los gases implicados en la respiración son muy solubles en las membranas celulares y la mayor limitación de movimiento que presentan es la tasa de difusión a través del agua tisular.

La composición del gas alveolar es diferente a la del gas atmosférico por varias causas ya que sólo es sustituido parcialmente durante la respiración, y además se está absorbiendo continuamente O_2 del aire alveolar y está difundiendo CO_2 desde la sangre pulmonar a los alvéolos. A su vez, la humidificación del aire atmosférico seco que penetra en las vías respiratorias, hace que el vapor de agua con que se humidifica diluya los otros gases del aire inspirado.

Los pulmones a su vez mantienen un volumen de aire, que se conoce como capacidad residual funcional (CRF), que es de unos 2.3 litros en el varón y que se renueva lentamente. Cada respiración normal introduce en los alvéolos unos 350 - 400 ml, con lo que la tasa de renovación es lenta. La estabilidad de la composición alveolar es útil para evitar variaciones bruscas en la oxigenación tisular y el pH al interrumpirse temporalmente la ventilación. En cuanto al aire espirado está compuesto de una mezcla de aire del espacio muerto (aire atmosférico saturado de vapor de agua) y de aire alveolar. Así la primera porción espirada es aire humidificado típico, mientras que al final sólo se espira gas alveolar.

Una vez que el O_2 ha difundido de los alvéolos (**Figura 4**), se transporta mayoritariamente combinado con la Hb (98.5% del total) a los capilares tisulares,

donde se libera para ser utilizado por las células. A nivel del mar, la $P_{A}O_2$ es de entorno a 104 mmHg, y en la sangre venosa mezclada es de 40 mmHg. Cuando la sangre ha recorrido un tercio del trayecto capilar alveolar ya alcanza un valor próximo a 104 mmHg. Esta gran velocidad de difusión del O_2 y de saturación de la sangre es muy útil para situaciones en que aumenta mucho el gasto cardíaco, como ocurre durante el ejercicio, y el tiempo de permanencia de la sangre en los capilares pulmonares se reduce considerablemente.

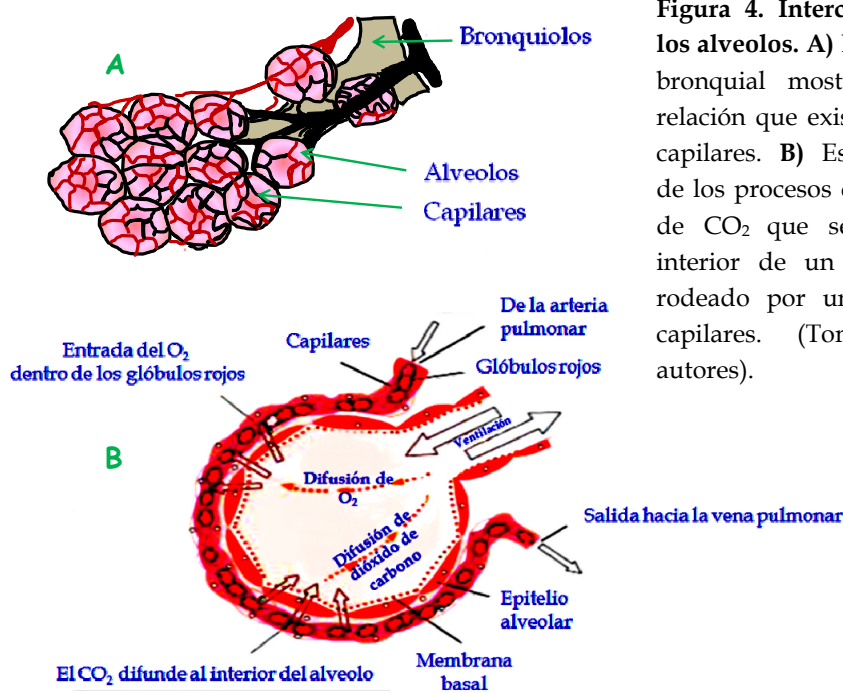


Figura 4. Intercambio gaseoso en los alveolos. A) Estructura del árbol bronquial mostrando la estrecha relación que existe entre alveolos y capilares. B) Esquema explicativo de los procesos de difusión de O_2 y de CO_2 que se producen en el interior de un alveolo pulmonar rodeado por una extensa red de capilares. (Tomada de varios autores).

El O_2 total unido a la Hb en la sangre arterial, saturada al 97%, es de unos 19.4 ml/100 ml de sangre, cantidad que se reduce hasta los 14.4 ml al pasar por los capilares de la circulación sistémica. Esto da una cantidad de O_2 cedido a los tejidos de 5 ml/100 ml de sangre en condiciones normales (lo que contabiliza unos 250 ml de O_2 , que es el O_2 que consume el organismo humano en reposo). Durante el ejercicio intenso, las células musculares activas usan O_2 en una tasa elevada, de modo que la sangre venosa que llega a los pulmones es mucho más pobre en O_2 . La reserva capilar pulmonar permite la saturación de la Hb y la normalidad de la PO_2 en la sangre arterial. El aumento concomitante del gasto cardíaco hace posible el ajuste entre la capacidad de transporte de O_2 por el aparato circulatorio y el aumento de extracción de O_2 por los músculos activos. En situaciones de hipoxia

moderada, hasta una PO_2 de 60 mmHg, la Hb de la sangre arterial sigue saturada a un nivel del 89%, con lo que se siguen cediendo unos 5 ml de O_2 por cada 100 ml de sangre a los tejidos, manteniendo la PO_2 tisular apenas sin modificaciones.

3. COMPORTAMIENTO DE LOS VASOS PULMONARES FRENTE A LA HIPOXIA: VASOCONSTRICCIÓN PULMONAR HIPÓXICA (VPH)

3.1 Descubrimiento y significado de la VPH

Según hemos comentado ya, los mecanismos que minimizan los efectos perjudiciales de la hipoxia pueden dividirse en **respuestas adaptativas lentas**, que requieren transcripción de genes, y **respuestas fisiológicas agudas**, que tienen lugar en segundos o minutos, como la VPH, que optimiza la relación V/Q y la activación de los CC, que incrementan la ventilación. Las respuestas adaptativas lentas están orquestadas por factores de transcripción, como el factor inducible por hipoxia (HIF) que activa la transcripción de genes con efecto sobre la respuesta hipóxica: EPO, transportador de glucosa, enzimas glicolíticos y factores angiogénicos. El efecto neto de las respuestas que modifican la expresión génica es mejorar la adquisición de O_2 y la generación de energía para un suministro dado de O_2 , mientras que el efecto de las respuestas fisiológicas agudas, como la VPH y la hiperventilación, es mejorar a nivel pulmonar la captación de O_2 por el organismo.

A mediados del siglo XIX, se desarrollaron técnicas que permitieron registrar las presiones intravasculares en animales vivos. Los estudios realizados por fisiólogos como Ludwig (1847) estimularon el interés por el conocimiento de la función circulatoria. En 1852, Beutner registró las primeras medidas de la PAP que era de media de 29.6 mmHg en el perro, 17.6 mmHg en el gato y 12.1 mmHg en el conejo. Beutner también observó fluctuaciones en la PAP, que atribuía a la actividad cardíaca y a la ventilación y descubrió que la interrupción de la ventilación por un “largo período de tiempo” causaba un incremento en la PAP que se revertía al restaurar la ventilación. Posteriormente, otros laboratorios han investigado los efectos de la respiración sobre la circulación; en particular, los cambios en la PAP y la presión arterial sistémica (PAS) tras un proceso de asfixia. En animales anestesiados y paralizados con curare, el cese de la ventilación

artificial provocaba un aumento asíncrono en la PAP y la PAS de ~200 y 200-400% de la línea base, respectivamente, seguido de una caída en la PAS junto con bradicardia progresiva y un aumento adicional en la PAP de ~200-500% de la línea base (Bradford y Dean, 1894; Wood, 1902). Si la ventilación no se restituía, la PAP revertía su aumento para caer en paralelo con la PAS y se producía rápidamente la muerte del animal. Sin embargo, las explicaciones del aumento inicial en la PAP fueron más controvertidas. Bradford y Dean, en 1894, denominaron al aumento de la PAP tras un periodo de asfixia como “una constricción activa de los vasos pulmonares” y Wood en 1902, entre otras propuestas, sugirió que podría deberse a la contracción directa de las arterias de la circulación pulmonar lo que pronto hizo que esta hipótesis fuese aceptada como la más probable por la mayoría de investigadores. Durante casi medio siglo no hubo grandes aportaciones al tema. Pero en 1946, Von Euler y Liljestrand redescubrieron los efectos opuestos de la hipoxia sobre la circulación sistémica y pulmonar felina y describieron el papel de la VPH como un mecanismo adaptativo encaminado a mejorar las condiciones de utilización del aire alveolar. En 1947, Motley y cols. observaron que la respiración de aire al 10% de O₂ duplicaba la resistencia vascular pulmonar (RVP) en los seres humanos, mientras que la resistencia vascular sistémica (RVS) disminuía de forma paralela. A partir de este trabajo de Von Euler y Liljestrand, considerado como la primera descripción de la VPH, muchos autores la han verificado tanto en animales intactos como en pulmones aislados.

La mayoría de estudios en animal intacto demostraron que la ventilación regional del pulmón con mezclas de gases hipóxicas provocaba desviación del flujo cardíaco fuera de la región hipóxica. Los estudios en pulmón aislado confirmaban que la respuesta pulmonar presora a la hipoxia no dependía de influencias neurales o humorales de fuera del pulmón, validando la propuesta de Von Euler y Liljestrand de que la hipoxia podía actuar a través de mecanismos locales para causar la VPH y optimizar así la relación V/Q local (Sylvester et al., 2012).

Los estudios de Marshall y Marshall (1983) concluyeron que la P_AO₂, más que la P_vO₂, era el principal estímulo para la VPH, citando que “la P_AO₂ tiene un mayor efecto... sobre la VPH... que la P_vO₂... debido principalmente al intercambio de O₂ entre el gas alveolar y la sangre en las pequeñas arterias

pulmonares” y concluyeron que la VPH “... se desencadenaba por cada célula de músculo liso que responde a la tensión de O₂ en sus proximidades, dentro de la pared arterial pulmonar. Son las arteriolas pulmonares de resistencia (<200 µm), rodeadas por los alveolos, las que responden más a la P_AO₂ y manifiestan de forma más enérgica la VPH (ver Archer et al., 2004; Sylvester et al., 2012).

En suma, la VPH puede describirse como el incremento rápido, reversible y que no muestra adaptación, de la RVP que se desencadena por una hipoxia alveolar moderada (P_AO₂ =70-30 mm Hg) a través de un mecanismo intrínseco de la propia circulación pulmonar, especialmente de su árbol arterial (y en menor medida de sus venas) y que se mantiene incluso en pulmones aislados perfundidos. Es un mecanismo muy conservado en mamíferos y también en los humanos y aunque está modulado por el endotelio pulmonar a través de la liberación de una serie de sustancias, persiste en anillos de AP sin endotelio y en CMLAP aisladas. En hipoxia severa (PaO₂ <20 mmHg), se observa una constricción breve seguida de vasodilatación pulmonar (Sylvester et al., 2012).

El significado de la VPH en situaciones de ventilación regional desigual de distintas zonas del pulmón es bien claro: en las zonas con ventilación disminuida o nula, la P_AO₂ disminuye, lo que promueve contracción casi instantánea de las CMLAP de las zonas afectadas y desvío del flujo hacia zonas adecuadamente ventiladas. Así pues, la VPH evita un efecto *shunt* redistribuyendo la sangre hacia zonas bien ventiladas. Para apreciar el alcance real de la VPH frente a la ventilación regional desigual, cabe preguntarse si dicha ventilación regional desigual ocurre con frecuencia o por el contrario es una situación que sólo se observa en el laboratorio. La respuesta es que la ventilación alveolar desigual ocurre en muchos tipos de patologías pulmonares tales como neumonías no generalizadas, zonas atelectásicas, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) moderada, obstrucción bronquial por tumor o cuerpo extraño, etc., patologías frecuentes en la clínica humana. Además, bajo anestesia general y en particular en todas las situaciones de cirugía torácica se producen alteraciones regionales de la ventilación que acarrearían desequilibrios V/Q y arterialización inadecuada de la sangre. La VPH minimiza o tiende a minimizar los desequilibrios V/Q y a mejorar la PaO₂, como lo demuestra el hecho de que en muchas de las situaciones mencionadas la

administración de potenciadores de la VPH mejora la oxigenación de la sangre (Marshall et al., 1994; Gorecka et al., 2003; Roze et al., 2011; Sylvester et al., 2012).

Otro aspecto distinto a considerar es el significado de la VPH en la hipoxia hipóxica generalizada de grandes alturas, es decir, ¿constituye la VPH de grandes alturas una respuesta adaptativa beneficiosa para el organismo? La primera clave de la respuesta es conocer la magnitud de la VPH que se encuentra en situaciones de hipoxia fisiológica y el grado de hipertensión pulmonar que genera. De acuerdo con el libro de Comroe de Fisiología Respiratoria (1974), la presión pulmonar media en sujetos nativos a altitudes > 5000 m sobre el nivel del mar no llega a los 40 mmHg. En tres estudios realizados en sujetos sanos en laboratorios de grandes alturas (≈4500 m), la presión pulmonar sistólica tras periodos de adaptación relativamente cortos (< de 15 días), fue siempre inferior a 43 mmHg (Ghofrani et al., 2004; Richalet et al., 2005; Scherrer et al., 1996). Por lo tanto, podríamos decir que los aumentos de PAP generados por la VPH son moderados y considerablemente menores a los encontrados en la clínica humana (p.ej., EPOC).

Una segunda clave a considerar es si este nivel de PAP causa efectos deletéreos. La existencia de hipertrofia ventricular derecha (que sería consecuencia directa del aumento de la PAP) en nativos de grandes alturas, es conocida desde la década de los 1950, pero no consta que esta hipertrofia produzca ninguna limitación en reposo ni pérdida de la tolerancia a la actividad física (Rubin y Naeije, 2004). El otro efecto perjudicial atribuido a la VPH es la aparición de edema pulmonar. En una serie de estudios realizados en alpinistas y recopilados por Ward y cols. (1995) muestran que las incidencias de aparición de edema pulmonar son del 2.5% a 4.243 m y descienden al 0.6% a 3.700 m. No parece pues que el edema pulmonar constituya un efecto deletéreo importante. De hecho, estudios posteriores realizados a 4.243 m, muestran que tras haber instruido de los posibles riesgos a los alpinistas, la incidencia de edema disminuyó. Ward y cols. concluyen que la VPH causa un aumento de la PAP y de la presión en ventrículo derecho, sin aumentar la presión capilar pulmonar y por tanto sin riesgo de aparición de edema.

Pero la pregunta no es si la VPH de grandes alturas causa patología, sino si es beneficiosa, lo que debería reflejarse en una mejora en la oxigenación de la sangre así como en una posible disminución de la incidencia de edema. Pues bien

hay tres estudios que han abordado el tema sometiendo a sujetos a grandes alturas y tratándoles con vasodilatadores para minimizar o contrarrestar la VPH (*NO inhalado*; Scherrer et al., 1996; *sildenafil*; Ghofrani et al., 2004; Richalet et al., 2005). Los efectos encontrados no son consistentes entre los distintos estudios, pero parecería que la VPH podría ser perjudicial. En nuestra opinión (ver González, 2006) sin embargo, los resultados de los estudios no son concluyentes, ya que en ningún caso fue posible excluir los efectos sistémicos de los tratamientos. Por tanto, podríamos decir que el carácter adaptativo y beneficioso de la VPH generalizada de grandes alturas no es fácilmente evidenciable. La conclusión de Marshall y cols. en 1994: "*The activities of hypoxic pulmonary vasoconstriction span the range from homeostasis to pathophysiology*" asignando un papel homeostático a la VPH, resume de forma sencilla la discusión que hemos presentado.

Sin embargo, como ya hemos visto, no hay duda de que durante la vida fetal la VPH juega un papel decisivo en la supervivencia del feto, ya que el alto nivel de resistencias en la circulación pulmonar fuerza a la sangre oxigenada de la placenta, mezclada con sangre venosa principalmente de territorios drenados por la cava superior y que bombea el ventrículo derecho, a desviarse por el "*ductus arteriosus*" hacia la circulación sistémica.

3.2 Mecanismos de la VPH

Fue el trabajo de Madden et al. (1992) el que demostró que la detección de la hipoxia era un mecanismo o propiedad intrínseca de las CMLAP. Estos autores aislaron CML de arterias cerebrales y de tres tamaños de arterias pulmonares (<200, 200-600 y >800 μm) de gato y las estudiaron 72-96 h más tarde. Midieron la longitud de las fibras en respuesta a la hipoxia y a agentes vasoactivos típicos (norepinefrina; NE y serotonina; 5-HT) usando una camarita de perfusión colocada en un microscopio invertido. Según puede verse en el panel inferior en la **Figura 5**, sólo las células de las AP de pequeño y mediano calibre se contrajeron con la hipoxia. Aunque no se muestra en la figura, los autores observaron que todas las células se contraían en respuesta a los agentes vasoactivos. El patrón de respuestas a la hipoxia, concluyen los autores, indica que al menos en el gato, el sensor hipóxico está localizado dentro de las propias CML. Por tanto se había terminado

con las llamadas hipótesis de los mediadores liberados o bien por el endotelio, los cuerpos neuroepiteliales o las células cebadas.

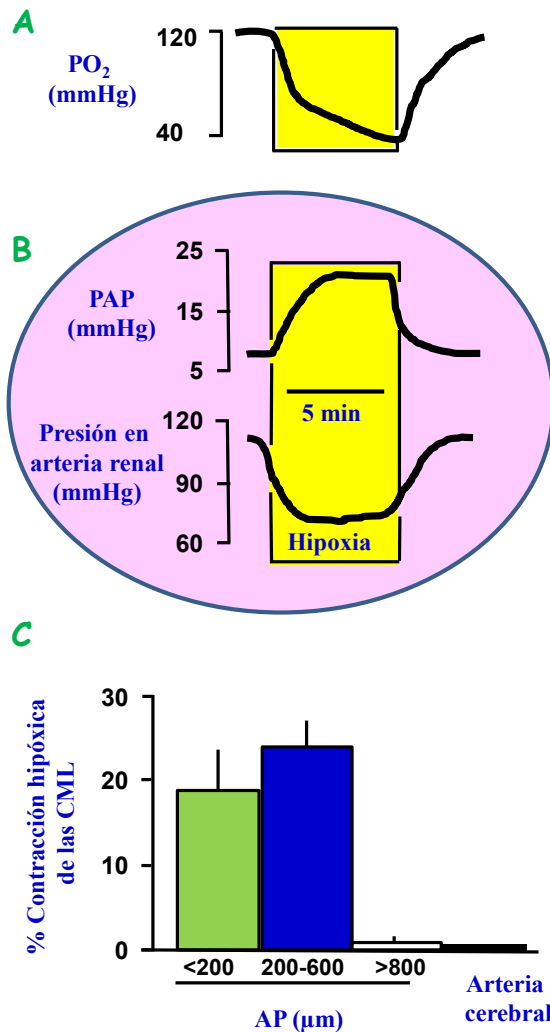


Figura 5. VPH. A) Se muestra un registro de la PO₂ arterial como resultado de un pulso de 5 min de duración. B) Se muestran las respuestas opuestas de la PAP y la PAS tras la aplicación de dicho pulso hipoxico. C) Se muestra que son las CML de los vasos pulmonares de resistencia (arteriolas de pequeño y mediano calibre) las que se contraen frente a la hipoxia. La arteria cerebral tampoco se contrae en respuesta a la hipoxia. (Tomado de varios autores).

¿Cómo detectan las CMLAP la hipoxia y cómo se genera la contracción en respuesta a la misma? El descubrimiento de los canales de K⁺ en las CQCC en 1988 (López-Barneo et al., 1988) llevó a explorar la posible existencia de canales análogos en las CMLAP. Y en efecto, dos grupos, casi simultáneamente, describieron la existencia de canales de K⁺ sensibles a la hipoxia en CMLAP (Post et al., 1992; Yuan et al., 1993). La conclusión fue que la inhibición de los canales de K⁺ debía de ser un evento clave que liga la hipoxia a la VPH causando la despolarización de las CMLAP y la subsiguiente entrada de Ca²⁺ en las células. De hecho el modelo vigente de la transducción hipoxica en las CMLAP durante más de una década (Archer y Michelakis, 2002; Michelakis et al., 2004) era idéntico al que González et al. (1992, 1994) habían propuesto para las CQCC (**Figura 6**) y algunos autores

siguen manteniendo vigente el presente modelo de VPH, siendo las etapas marcadas en azul las peor conocidas y por tanto las más controvertidas.



Figura 6. Cascada de transducción hipóxica en las CQCC y en las CMLAP. Las etapas marcadas en azul representan los aspectos más controvertidos en ambos tipos celulares. (Tomado de Obeso et al., 2006).

Sin embargo, otros autores proponen esquemas distintos, atribuyendo un papel en cierto modo secundario, a los canales de K^+ sensibles a la hipoxia. Utilizando registros electromiográficos en segmentos de AP aislados y perfundidos con solución salina control, la respuesta que se obtiene es del tipo de la mostrada en la parte A de la **Figura 7**. Como podemos ver esta respuesta es muy distinta a la que se obtiene con los registros *in vivo*, midiendo PAP donde la respuesta aumenta progresivamente hasta alcanzar una meseta estable y duradera proporcional al grado de hipoxia (**Figura 5**). Existe sin embargo, en este caso, un pico transitorio de aumento de tensión que en unos pocos minutos cae marcadamente para luego incrementar de forma progresiva hasta alcanzar una meseta más o menos estable y con niveles de tensión de \approx el 50% del pico inicial transitorio. Cuando el registro se obtiene en un medio sin Ca^{2+} , el pico inicial de tensión se atenúa y la tensión cae incluso por debajo de la obtenida en normoxia con solución salina control (**Figura 7A**).

La combinación de registros en segmentos de arteria intactos con segmentos sin endotelio, en condiciones con y sin Ca^{2+} , ha permitido definir 3 fases en la

respuesta contráctil de las AP a la hipoxia (**Figura 7B**): la fase 1, que es intrínseca a las CMLAP y que dependería fundamentalmente del Ca^{2+} liberado de los depósitos; la fase 2, que es también generada intrínsecamente en las CMLAP y depende del Ca^{2+} extracelular (Ca^{2+}_e), de la entrada de Ca^{2+} en dichas células; y finalmente, la fase 3 que también depende del Ca^{2+}_e y desaparece en preparaciones desnudas de endotelio por lo que se debería a la liberación de factores endoteliales que activan la contracción de las CMLAP, por lo que esta tercera fase, no es intrínseca a las células musculares. Los registros directos de Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_i) (**Figura 7C**) confirman las observaciones previas que acabamos de describir.

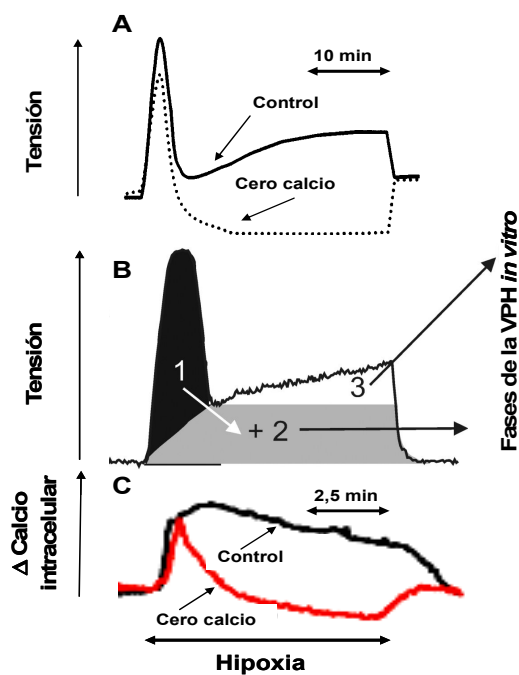


Figura 7. VPH in vitro. Esta figura está compuesta con datos de distintas publicaciones: **A)** Ward y Aaronson, 1999; **B)** Evans et al., 2011; **C)** Sylvester et al., 2012.

En la actualidad, este modelo se ha modificado ligeramente, ya que se ha propuesto la participación de distintos compartimentos del retículo sarcoplásmico en el papel jugado por el Ca^{2+} liberado de los depósitos tal y como se muestra en el artículo de Connolly et al. (2013; Figura 14). Estos dominios espacialmente separados (uno cercano a la membrana y otro más interno) contribuirían de forma diferente a las distintas fases de la VPH. No queremos dejar de reseñar que la valoración de las respuestas contráctiles en presencia y ausencia de Ca^{2+} es apreciada de forma distinta por diferentes autores, aunque todos ratifican el significado primordial de la entrada de Ca^{2+} con la observación de que en medios libres de Ca^{2+} la VPH queda limitada a una pequeña contracción transitoria o

desaparece del todo" (Connolly et al., 2013; Figura 3C; Shimoda y Undem, 2010; Sylvester et al., 2012).

Obviamente, a partir de esta descripción surge un número importante de preguntas que nos acercan a la problemática real de los mecanismos de la VPH. Por ejemplo:

1. ¿Qué hace la hipoxia en las CMLAP para promover la liberación del Ca^{2+} inicial durante la fase 1?
2. ¿En qué compartimento intracelular está el Ca^{2+} almacenado y por qué vía(s) alcanza la maquinaria contráctil?
3. ¿Por qué vías entra el Ca^{2+} desde el medio extracelular al interior de las CMLAP?
4. ¿Cuál es el papel real de los canales de K^+ sensibles a la hipoxia?

Las contestaciones a estas preguntas están ensambladas entre sí en lo que constituyen las posibles vías o modelos de transducción del estímulo hipóxico propuestos en las CMLAP. Por tanto, en la breve revisión que hacemos de cada modelo intentaremos dar contestación a las cuatro preguntas.

3.2.1 Hipótesis Redox

El laboratorio de Archer ha liderado un amplio número de publicaciones y revisiones (ver Weir y Archer, 2010) en las que el mecanismo clave sería que la hipoxia disminuye la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a nivel mitocondrial y a nivel de la NADPH oxidasa, siendo esta disminución la que produciría un aumento de los miembros reducidos de los distintos pares redox de las células (par glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG); par redox nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido/oxidado (NAD(P)H/NAD(P)), etc.) y en último término una reducción de los grupos sulfidrilos de los canales de K^+ sensibles a la hipoxia, disminuyendo su probabilidad de apertura (P_o) y por tanto causando despolarización, activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VOCC), entrada de Ca^{2+} y disparo de la contracción. Hay que señalar que la sensibilidad de los canales de K^+ al estado redox es muy variable, ya que unos subtipos de canales de K^+ disminuyen su P_o en respuesta a los reductores mientras que otros la aumentan (González et al., 2002). El canal de K^+ regulado por voltaje

Kv1.5, responsable de la transducción hipóxica según el laboratorio de Archer, disminuye su P_o en hipoxia y en respuesta a agentes reductores. A este modelo habría que añadir la observación hecha por Wilson et al. (2001) mostrando que el aumento de nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida (NADH) impide la degradación de ADP-ribosa cíclica (ADPRc), aumentando sus niveles. Este segundo mensajero activa los receptores de Rianodina (RyR) del retículo endoplásmico, actuaría promoviendo la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. Habría que añadir también que la maquinaria enzimática relacionada con la síntesis y degradación de ADPRc en los vasos pulmonares es paralela a su capacidad de responder a la hipoxia (al igual que lo es la actividad de la quinasa dependiente de AMP (AMPK; Evans et al., 2005; ver más adelante).

3.2.2 Hipótesis de las especies reactivas de O_2

Una propuesta o modelo totalmente opuesto es el liderado por el laboratorio de Schumacker: el efecto primario de la hipoxia es aumentar la producción de ROS a nivel mitocondrial; las ROS serían los mensajeros o factores claves en el disparo de la VPH. Como es obvio, esta propuesta choca frontalmente con la anterior, implicando que una o las dos no son correctas; de otro lado los mecanismos que conducirían a un aumento de ROS en hipoxia no están definitivamente resueltos. En una de sus múltiples revisiones recientes (ver p.ej. Schumacker, 2011; Mungai et al., 2011) este laboratorio propone que la hipoxia causa directamente un aumento de la producción de ROS a nivel del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial. Su propuesta concreta es que el ubiquinol totalmente reducido difunde al nicho de la membrana interna mitocondrial donde se aloja el complejo III, uniéndose a la membrana en el sitio Q_o . La transferencia de los dos electrones del ubiquinol sigue un orden preciso. El primer electrón es transferido a la proteína Rieske que contiene un grupo hierro-azufre con el resultado neto de que el ubiquinol se transforma en el radical ubisemiquinona con un solo electrón desapareado. La ubisemiquinona, normalmente cede el electrón desapareado que le queda a los citocromos b del complejo III, pero puede transferirlo de forma alternativa al O_2 para formar el radical anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). En cualquier caso, la molécula oxidada resultante, la ubiquinona, entra de

nuevo en el pool de las quinonas, lista para aceptar otro par de electrones del complejo I o II y transformarse en ubiquinol para reiniciar el ciclo (Turrens, 2003; Schumacker, 2011). Sin embargo no se sabe cómo en hipoxia este proceso de transferencia de electrones para formar $O_2^{\bullet-}$ supera paradójicamente (la palabra es de Schumacker) al proceso de transferencia de electrones hacia el O_2 en situación de normoxia, ya que la formación de $O_2^{\bullet-}$ por la transferencia de un electrón al O_2 es directamente dependiente de la PO_2 (Turrens, 2003) por lo que tienen que entrar en juego mecanismos adicionales para explicar el aumento de la producción de $O_2^{\bullet-}$ en hipoxia. Taylor y Moncada (2010) proponen que el NO puede ser dicho factor y lo explican así: en normoxia, la citocromo oxidasa liga NO y lo oxida a nitrito y en hipoxia, a medida que la citocromo oxidasa va siendo reducida, el NO compite por el O_2 en su unión con la citocromo oxidasa, con el resultado neto de que la citocromo oxidasa se inhibe. Esta inhibición hace que se acumule el NO y que los complejos proximales de la cadena respiratoria se reduzcan, lo que facilitaría la cesión de electrones desapareados al O_2 y la formación de $O_2^{\bullet-}$. Sea cual fuere el mecanismo de la producción de $O_2^{\bullet-}$, o más en general el mecanismo de producción de ROS, la propuesta de transducción sería como sigue: la hipoxia conduce a un aumento de la producción de ROS que promueven la liberación de Ca^{2+} del retículo vía los RyR (fase 1). La liberación de Ca^{2+} promueve la activación de canales de Ca^{2+} operados por depósito (SOCC, *store operated calcium channels*) con la consiguiente entrada de Ca^{2+} ; la entrada de Ca^{2+} por los SOCC junto con la inhibición de canales de K^+ sensibles a la hipoxia causa la activación de los VOCC; en conjunto, ambas vías de entrada contribuyen a la génesis de la fase 2 de la VPH. La contribución relativa de los SOCC *vs.* los VOCC no está clara, con distintos autores dándoles un papel mayoritario a uno u otro según sus propios hallazgos (ver Park et al., 2010; Sylvester et al., 2012). Hay que mencionar que en CMLAP incubadas con RNA de interferencia (RNAi) para STIM1 (*Stromal interaction molecule 1*), el sensor de vaciado/llenado de depósitos de Ca^{2+} del retículo que cuando se vacían los depósitos interacciona con ORAI1 (*Calcium release-activated calcium channel protein 1*), un componente de los SOCC y activador de su apertura, se reduce marcadamente el aumento de Ca^{2+}_i , igualando casi la respuesta en un medio libre de Ca^{2+} (Lu et al., 2009). Esto indicaría que los SOCC juegan un papel

primordial, ya sea directa o indirectamente promoviendo la despolarización y contribuyendo a que se abran los canales operados por voltaje. Habría que añadir, además, que las ROS activan la síntesis de ADPRc lo que haría más dinámico el tráfico de Ca^{2+} en los depósitos (ver Sylvester et al., 2012).

Un modelo más elaborado, en el que se propone que el aumento de ROS es la señal de disparo de la VPH, ha sido propuesto por el laboratorio de Pérez-Vizcaíno de la Universidad Complutense de Madrid. En una serie de publicaciones (p.ej., Frazziano et al., 2011; Moreno et al., 2013) se sugiere el siguiente modelo: la hipoxia promueve un aumento de ROS de origen mitocondrial (sensible a rotenona), que actuarían de cebadores en la génesis de ROS. Las ROS mitocondriales activarían la esfingomielinasa neutra y ésta a una isoforma de la proteína quinasa C (PKC), la PKC ζ , que fosforilaría a la subunidad p47^{phox} de la NADPH oxidasa facilitando el ensamblaje del complejo enzimático y la producción masiva de ROS (sensibles a apocianina) que serían los efectores de la VPH. Las ROS inhibirían a los canales de K^+ con la consiguiente activación de los VOCC, entrada de Ca^{2+} y contracción. Este modelo tendría el gran interés, si se confirmara, de proporcionar dianas terapéuticas para la hipertensión pulmonar, ya que en todas las hipertensiones pulmonares clínicamente relevantes hay un componente de constricción hipóxica: los inhibidores de la esfingomielinasa neutra, los análogos inactivos de ceramida o los inhibidores específicos de la PKC ζ serían futuros agentes terapéuticos.

3.2.3 Hipótesis estado energético-AMPK

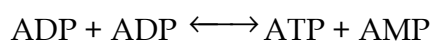
El tercer modelo de transducción propone a la proteína quinasa regulada por AMP (AMPK) como el sensor que mediaría la VPH. La AMPK es una enzima heterotrimérica formada por una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras, β y γ . El adenosín monofosfato (AMP) compite con el adenosín trifosfato (ATP) en su unión a la subunidad γ , de tal forma que cuando aumenta el AMP, éste desplaza al ATP y esta unión promueve la fosforilación de la subunidad α promoviendo su actividad catalítica. La AMPK fosforila un gran número de enzimas de rutas metabólicas que promueven la génesis de ATP, e inhibe, también por fosforilación, enzimas que promueven reacciones anabólicas consumidoras de

ATP. Hardie (2008) afirma que, la AMPK se activa en situaciones de crisis para mantener la funcionalidad de las células. Desde esta perspectiva, podemos preguntarnos si la hipoxia de una intensidad tan moderada como la que es capaz de generar VPH, es una situación de crisis para las CMLAP.

La carga energética de las células que puede tener un valor teórico entre 1 y cero, se define por la siguiente ecuación:

$$\text{Carga energética} = \frac{[\text{ATP}] + \frac{1}{2}[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

El valor sería de 1 si todos los fosfatos de adenosina estuvieran en la forma de ATP y sería de 0 si todos estuvieran en forma de AMP. En condiciones estables, en la generalidad de las células, tiene un valor entre 0.9 y 0.8 y las concentraciones molares del ATP, adenosín difosfato (ADP) y AMP están, respectivamente, en el rango de 5, 0.5 y 0.15 mM. Por tanto, las proporciones ATP/AMP son ≥ 30 (Evans et al., 2005). La mayor parte del ATP en las células se usa en reacciones que producen ADP + fosfato inorgánico (Pi) existiendo unas pocas reacciones (p.ej., la elongación de las proteínas) en las que el ATP genera AMP + P~P, sin embargo la mayor parte del AMP en las células proviene de la acción de la adenilato quinasa:



Aunque esta reacción es reversible, en periodos de mucha actividad celular cuando se genera mucho ADP o en hipoxia o déficit de sustratos cuando la síntesis de ATP es baja, el ADP se acumula y la reacción se desplaza hacia la derecha como un mecanismo rápido de mantener la disponibilidad de ATP. Y obviamente en estas condiciones el cociente ATP/AMP disminuye y se activa la AMPK, que en sentido estricto sería más un sensor del estado energético de las células que un sensor de O₂. Como en el caso del CC (González et al., 2010) podríamos preguntarnos: ¿a la PO₂ que se produce la VPH (30-70 mmHg; ver apartado 3.1) hay una disminución de la síntesis de ATP? La respuesta no es clara, aunque bien es cierto que en lisados de la muscular de vasos pulmonares ha sido descrito que el cociente ATP/AMP con un valor de 25 a presiones de 155-160 mmHg disminuyó a 12 tras incubaciones de 1h a 16-21 mmHg (Evans et al., 2005). Sin embargo, estas PO₂ (y este periodo de tiempo), de acuerdo con lo que hemos comentado en la sección anterior, habrían de considerarse generadoras de respuestas distintas a la

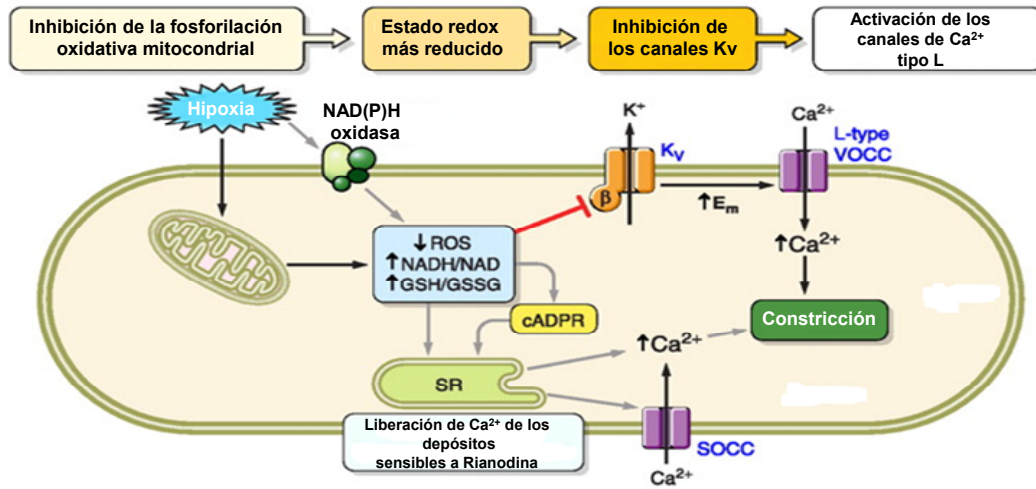
VPH. En un trabajo reciente, el grupo de Schumacker (Mungai et al., 2011), encuentra que en realidad la activación de la AMPK se produciría a través de la activación de canales de Ca^{2+} activados por la liberación de calcio (*calcium induced calcium release*; CICR) por acción de las ROS, sin aumento de los niveles de AMP.

El Prof. Mark Evans sigue proponiendo que la AMPK es el sensor de O_2 (Evans, 2006; Evans et al., 2011). Datos adicionales que apoyan su modelo son: 1) La AMPK aumenta la síntesis de ADPRc, que sería el promotor de la liberación de Ca^{2+} de los depósitos y del inicio de la VPH en su fase 1; 2) El AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida ribósido) que se metaboliza a un análogo de AMP, capaz de activar la AMPK, promueve contracción de los vasos pulmonares que, al igual que la VPH, es inhibida por bloqueo de los RyR; 3) Una pirrazolopirimidina permeable a las membranas celulares, el compuesto C, que es un inhibidor inespecífico de la AMPK, inhibe la VPH. Sin embargo, a pesar de estos hechos, hay otras observaciones que no sustentan el papel de la AMPK como sensor de la hipoxia. Por ejemplo, cabría esperar que la eliminación de la glucosa del medio de superfusión y la inhibición de la cadena respiratoria, que conducen a un aumento de actividad de la AMPK, potenciasen la VPH y sin embargo, el efecto de eliminar la glucosa posee efectos que son especie dependientes y los efectos de los inhibidores de la cadena respiratoria son variables, ya que unos la inhiben (sin afectar la contracción producida por otros agonistas) y otros no hacen nada. Hay pues datos a favor y en contra del papel de la AMPK como posible sensor de la hipoxia y hoy por hoy no puede aceptarse que la AMPK juegue el papel crítico en la VPH que el laboratorio del Prof. Evans propone (Sylvester y cols., 2012).

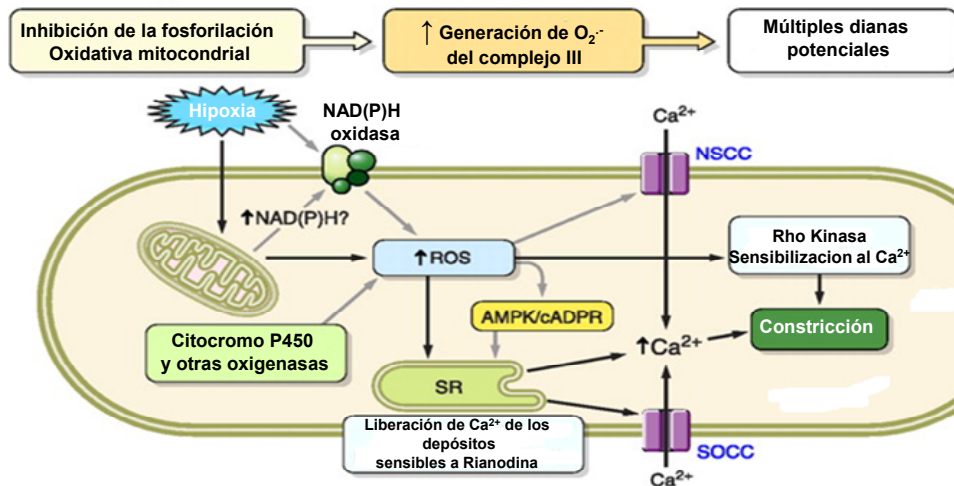
La **Figura 8** tomada de Sylvester et al. (2012) resume los datos que acabo de presentar sobre los distintos modelos de transducción de la VPH. Sin embargo no quiero terminar esta sección sin hacer unas consideraciones finales sobre el significado real de los canales de K^+ en las CMLAP. Son muchos los autores que han pretendido identificar “el canal de K^+ ” relevante para la respuesta a la hipoxia en estas células. Si nos fijamos en la **Figura 8** vemos que en las partes B y C de la figura no se hace referencia a los canales de K^+ y entonces cabe preguntarse si son o no necesarios para la VPH. Tras leer un gran número de publicaciones nuestro sentir es que sí, que son importantes, si no como disparadores de la fase 1 de la

VPH, al menos sí en la fase 2, facilitando la despolarización de las CMLAP y la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje.

A Hipótesis Redox



B Hipótesis de las especies reactivas de O_2 (ROS)



C Hipótesis del estado energético-AMPK

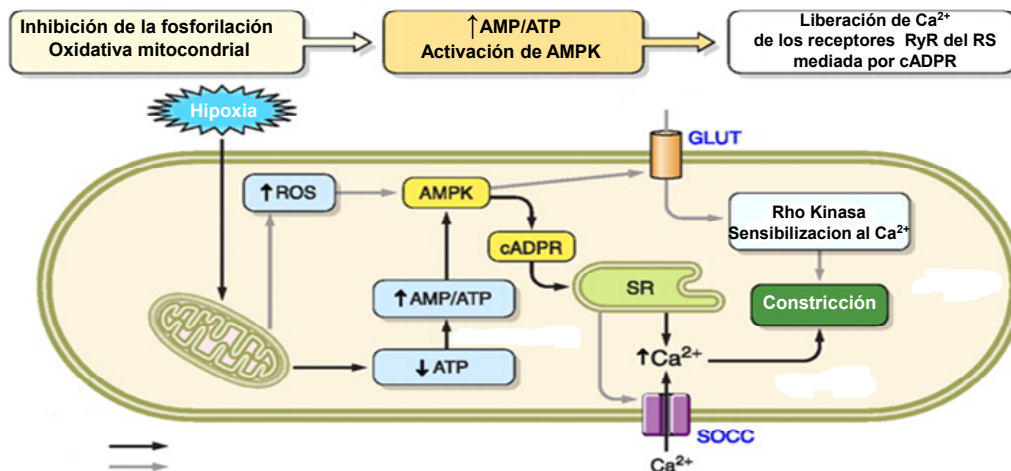


Figura 8. Modelos de transducción en la VPH. (Tomada de Sylvester et al., 2012).

En una revisión sobre el significado de canales de K⁺, Park y cols. (2010) enfatizan la diversidad de canales y su distribución regional diferente, con la noción *in mente* de que los canales que se expresan en los vasos de resistencia han de ser los importantes. Sólo aquellos canales capaces de contribuir al potencial de membrana (Em) podrían ser mediadores de la despolarización hipóxica (aunque si hay una despolarización previa producida por los SOCC este requisito no sería imprescindible). Sin embargo, los TASK no son importantes para la VPH y los Kv1.5 y Kv2.1 no satisfacen los criterios cinéticos y farmacológicos de la VPH.

4. HIPEROXIA PERINATAL Y VPH

La exposición perinatal de animales a hiperoxia (60% O₂, 0-4 semanas postnatales) produce hipotrofia del CC y disminución de la respuesta del órgano a la hipoxia en animales adultos cuando se monitoriza como actividad eléctrica en el NSC (Bavis et al., 2013; Bisgard et al., 2003, 2005; Erickson et al., 1998; Fuller et al., 2002; Ling et al., 1997 a, b, c; Prieto-Lloret et al., 2004; Wenninger et al., 2006). Sin embargo, cuando la respuesta del CC se mide como efecto reflejo de su estimulación, actividad en el nervio frénico o ventilación, la disfunción producida es apreciada de forma distinta. Nuestro laboratorio (Prieto-Lloret et al., 2004), al igual que en los estudios de Dager y cols. (2003) y Wenninger y cols. (2006), no observa alteraciones ni en la ventilación basal ni en la respuesta ventilatoria a test de hipoxia o hipercapnia al estudiar a los animales a los 4 meses de edad. Hemos de señalar no obstante que en el estudio de nuestro laboratorio solo se midió la frecuencia respiratoria, ya que el equipo disponible en aquel momento no permitía medir el volumen corriente. Ling y cols. (1998) describieron una disminución marcada en la respuesta a la hipoxia a los 4 meses de edad, respuesta que se recuperaba y que a los 14 meses las respuestas de los animales hiperóxicos perinatales eran normales. Por el contrario Fuller y cols. (2002; ver también Bavis et al., 2013) sostiene que la alteración de la respuesta a la hipoxia no se recupera, que es permanente. Tiene interés señalar que Prieto-Lloret et al. (2004) y muy recientemente Kim y cols. (2013) concluían que en los animales hiperóxicos sólo sobrevivían un porcentaje pequeño de CQ (de ahí la atrofia del CC) y las que

sobrevivían respondían de forma inadecuada (respuesta secretora y cinética del aumento de Ca^{2+} producido por la hipoxia anómalas), y dado que las respuestas a alto K^+ extracelular (K^+_e) eran normales, el daño molecular en estas células ha de localizarse en una etapa previa a la despolarización y a la entrada de Ca^{2+} .

A pesar de que la literatura sobre el efecto de la hiperoxia perinatal y funcionalidad del CC es abundante, no hay publicado ningún estudio sobre el posible papel de la hiperoxia perinatal sobre la VPH, y ello a pesar de que según hemos venido comentando, las cascadas de transducción hipóxica en las CQCC y en las CMLAP han sido consideradas como idénticas o muy similares en muchos laboratorios (ver apartado anterior). Prieto-Lloret en su Tesis Doctoral (2005) presentó resultados de una serie de experimentos realizados en una preparación de pulmón aislado *in situ* en los que mostraba que la hiperoxia perinatal producía pérdida de la VPH, mientras que no se modificaba la respuesta constrictora a alto K^+ ni se observaba atrofia de la muscular de vasos pulmonares de resistencia. Estas observaciones han constituido el punto de partida de esta Tesis Doctoral. Pretendíamos confirmar los hallazgos en una preparación *in vivo* y, caso de confirmar la pérdida de la VPH, ahondar en los posibles mecanismos de dicha alteración (ver Objetivos). Abordamos este problema por la gran importancia potencial que podría tener desde el punto de vista médico. En efecto, la oxigenoterapia en recién nacidos es muy frecuente, particularmente en los niños prematuros y aunque el objetivo de dicha terapia es conseguir una saturación de la Hb normal (>98%; esto es, no se pretende conseguir una hiperoxemia), el hecho es que la $\text{P}_{\text{A}}\text{O}_2$, que es el estímulo para las CMLAP, es obligatoriamente alta. Además, desafortunadamente, en la oxigenoterapia a los recién nacidos, son frecuentes accidentes indeseables de hiperoxemia real, bien conocidos por los daños irreversibles que producen en retina (retinopatía del prematuro; Bavis et al., 2013; Hartnett y Penn, 2012; Tracy et al., 2004). En estos casos desafortunados la situación sería superponible a la situación en nuestros animales. Pues bien, si la hiperoxemia dañara la VPH de forma permanente, ello significaría la pérdida de un mecanismo homeostático que, en situaciones de ventilación regional desigual (neumonías, atelectasias, EPOC, obstrucciones bronquiales, etc.) tendería a agravar o no compensaría en absoluto la hipoxemia producida por la enfermedad. Además, en

situaciones de anestesia general y particularmente en casos de cirugía torácica, se producen alteraciones regionales de la ventilación cuyos efectos deletéreos sobre la oxigenación de la sangre son minimizados por la VPH, que es quien tiende a asegurar una PO₂ arterial normal. De hecho, en todas estas situaciones patológicas se usan con frecuencia potenciadores de la VPH para mejorar la saturación de la Hb en sangre arterial (Glasser et al., 1983; Gorecka et al., 2003; Roze et al., 2011). Por tanto, en el presente trabajo consideramos de gran interés continuar explorando los hallazgos hechos por Prieto-Lloret en 2005.

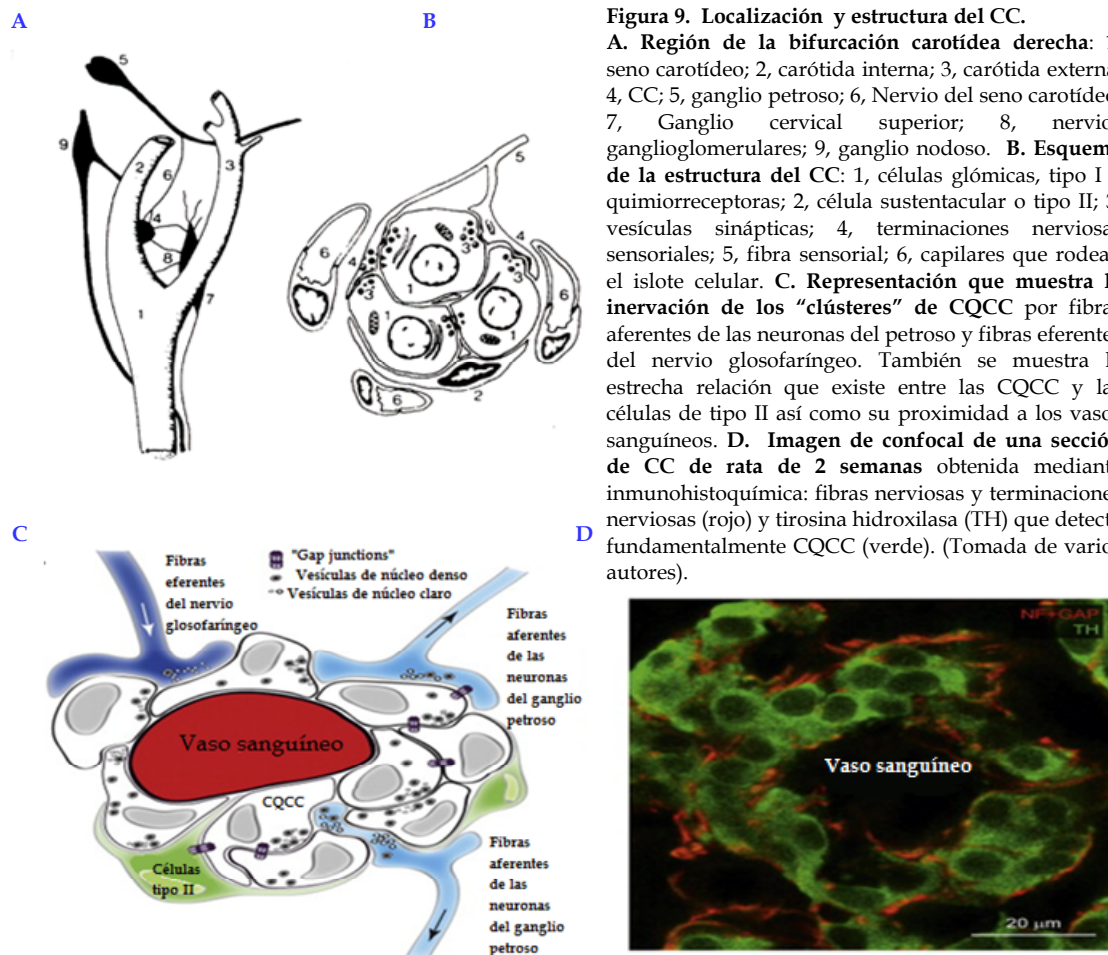
5. ESTRUCTURA DEL CC

5.1 Anatomía

El CC, o *glomus caroticum*, es un órgano par localizado en las proximidades de la bifurcación de la arteria carotídea (ver **Figura 9** para más detalles). Está formado de islotes celulares que forman el parénquima glómico, rodeados de tejido conectivo. Dentro de estos islotes encontramos células glómicas, quimiorreceptoras o de tipo I, y células sustentaculares o de soporte, o tipo II. Las de tipo I o CQ son más numerosas, de núcleo redondo y claro, con un citoplasma rico en vesículas de núcleo denso y ocupan el centro de los islotes. Las células tipo II son aplanadas, sin especializaciones citoplasmáticas, y están situadas en la periferia de los islotes.

El CC recibe irrigación de la arteria glómica, que suele nacer en la carótida externa, se ramifica y origina una intrincada red de capilares que se estima es 5 veces más densa que la red capilar que irriga el cerebro, lo que da al órgano su característico color rosado. Los capilares establecen una relación estrecha con los islotes celulares, minimizando el espacio de difusión del O₂ entre los capilares y las CQ (inferior a 20 µm). A pesar del elevado consumo de O₂ del CC (1.5 ml O₂/100 g/min) la diferencia arterio-venosa del O₂ es mínima gracias al elevado flujo de sangre que lo atraviesa (1.3 l /100 g/min), lo que permite al CC funcionar incluso en situaciones de hipoxia extremas. Esta elevada capilarización determina que en normoxia ningún área del CC se encuentra con PO₂ inferiores a los 40 mmHg.

Existe un control reflejo del flujo sanguíneo que en hipoxia incrementa el riego al CC. Este aumento del flujo sanguíneo se corresponde con la hiperemia funcional de cualquier tejido, y además representa un mecanismo para evitar la sobreactivación del CC, ya que la vasodilatación aumenta el aporte de O₂ al CC. En situaciones de hipoxia crónica (HC), con demanda sostenida de O₂ al CC, se produce una hipertrofia de los capilares existentes y la formación de otros nuevos.



Las CQCC reciben innervación sensorial a través del NSC. Las fibras sensoriales provienen de neuronas del ganglio glossofaríngeo inferior o petroso, y penetran en los islotes, donde forman sinapsis con las CQ. Además el CC recibe innervación simpática en sus vasos, y parasimpática que se origina en las neuronas presentes en la superficie del CC (agrupadas formando microganglios), y en otras neuronas dispersas a lo largo del NSC. Estas fibras, de carácter nitrérgico-colinérgico, controlan el flujo sanguíneo al CC, y por lo tanto su actividad funcional (Campanucci et al., 2003; Wang et al., 1995). Las fibras simpáticas que inervan los vasos del CC tienen un significado funcional opuesto al de las parasimpáticas.

5.2 Ultraestructura y neuroquímica

Vistas al microscopio electrónico las células tipo I o CQ presentan numerosas vesículas de núcleo denso, que al igual que las células cromafines de médula adrenal, contienen catecolaminas (CA) y péptidos opioides. También poseen vesículas pequeñas de núcleo claro, que podrían contener acetilcolina (ACh).

Las células de tipo II están presentes con un número más bajo que las células tipo I y se encuentran en estrecha asociación con éstas. Hay un cociente aproximado de 1 célula tipo II por cada 4 células tipo I (McDonald, 1981). Las células de tipo II no tienen vesículas de núcleo denso ni de núcleo claro y siempre se les ha otorgado la función de células de soporte aunque recientemente se les considera células madre quimiorreceptoras (López-Barneo et al., 2009; Pardal et al., 2007) y pueden participar activamente en la señalización paracrina durante la quimiotransducción.

Otras estructuras a señalar serían las “*gap-junctions*”, que proporcionan un alto grado de acoplamiento eléctrico (Eyzaguirre, 2007) entre CQ adyacentes. Desde el punto de vista ultraestructural las terminaciones nerviosas sensoriales son polimorfas. Existen contactos entre las terminaciones y las células en los que las especializaciones presinápticas se encuentran en la célula glómica y otros en los que se encuentran en la terminación nerviosa. Por otro lado, entre una misma célula y una terminación nerviosa pueden existir contactos en los que la polarización funcional aparente tiene una dirección dada y en una zona adyacente tiene sentido opuesto (sinapsis recíprocas). Las sinapsis químicas y eléctricas (McDonald, 1981) entre estos elementos junto con la presencia de varios NT y sus receptores en las células tipo I y/o en las terminaciones nerviosas, permite un complejo procesamiento sensorial en el CC. Este procesamiento implica vías de señalización tanto sinápticas como autocrinas-paracrinas.

5.3 Neurotransmisión en el CC

La respuesta del CC evaluada por la frecuencia y el patrón de las descargas en el NSC, está modulada por las acciones de varios NT y neuromoduladores que

actúan sobre receptores ionotrópicos y metabotrópicos en el CC (Nurse y Piskuric, 2013; Iturriaga y Alcayaga, 2004; González et al., 1994; Nurse, 2010). Entre las sustancias presentes en el CC que son conocidos NT se encuentran: CA (dopamina, DA; norepinefrina, NE), ACh, sustancia P, péptidos opioides, adenosina, ATP y otros NT de carácter peptídico. También se han descrito mediante técnicas de *binding* y RT-PCR e hibridación *in situ*, la presencia de receptores para algunas de estas sustancias localizados en las CQ y/o en las terminaciones nerviosas sensoriales.

La aceptación, durante la última década del siglo XX, de que las CQ eran los transductores de los estímulos químicos en el CC condujo a la búsqueda de los mecanismos que explicasen cómo se transmitía la información desde las CQ hacia las terminaciones nerviosas sensoriales aferentes del NSC, siendo la DA y la ACh los NT candidatos líder en los primeros estudios de las sinapsis de las CQCC.

En el caso de la DA, nuestro laboratorio sigue considerando clave su papel como NT principal apoyándose en los resultados obtenidos a lo largo de los años (González et al., 1994; Iturriaga et al., 2009) fundamentalmente en CC de conejo. La DA satisface la mayoría de los criterios para ser considerada un NT excitatorio en el CC (González et al., 1994, 2003) ya que es la catecolamina más predominante en cuanto a su síntesis, almacenamiento y liberación en respuesta a estímulos naturales (p.ej. hipoxia), en el CC. La sugerencia de que la DA actúa como un NT excitatorio en el CC fue muy apoyada, tal y como hemos dicho, por los primeros estudios de neurotransmisión realizados en conejo (Fidone y González, 1982; Fidone et al., 1982 a, b; Pérez García et al., 1992; ver Iturriaga et al., 2009), donde utilizando métodos radiométricos, se demostró que la hipoxia incrementaba la liberación de DA de una manera dependiente de Ca^{2+} en las CQCC de conejo *in vitro*, siendo estas observaciones confirmadas más tarde en gato y en rata (Rigual et al., 1986; Vicario et al., 2000 a). Por otra parte existen evidencias de que hay receptores de DA tipo II (D2) en las CQCC y también en las neuronas del ganglio petroso (PNs) (Dinger et al., 1981; Gauda, 2002). Sin embargo, existe cierta controversia sobre su papel, ya que existen diferencias genuinas entre especies: mientras que en el conejo, la DA exógena produce quimioexcitación, en el gato o la rata, produce inhibición y además, tal y como otros grupos han señalado, los

aumentos altamente conservados en la descarga sensorial inducida por la estimulación hipóxica repetida en el CC no están relacionados con la disminución progresiva de amplitud en el flujo de salida de CA en la rata y el gato (Donnelly, 1996; Iturriaga et al., 1996). Las diferencias citadas entre especies sugieren pues, que en el conejo la actividad quimiosensorial parece estar generada con una importante participación de sinapsis dopaminérgicas (Iturriaga et al., 2009), mientras que en el gato y la rata, la DA tiene un papel predominante como modulador-inhibitorio.

En la actualidad, también se considera que el ATP es un NT clave en la sinapsis CC-NSC (Nurse, 2010), ya que en co-cultivos de clústeres aislados de CQCC con PNs (Zhang et al., 2000), se observa que los bloqueantes purinérgicos P2X inhiben las respuestas postsinápticas evocadas por la hipoxia o la hipercapnia (Nurse, 2010); además *knockouts* (KO) para receptores P2X2 exhiben una respuesta ventilatoria hipóxica muy atenuada (Rong et al., 2003). Además, las terminaciones nerviosas aferentes del CC de la rata expresan receptores P2X2/3 (Zhang et al., 2000; Prasad et al., 2001) y la hipoxia induce la liberación de ATP tanto en CC *in vitro* (Buttigieg y Nurse, 2004) como *in vivo*. Por último, los estudios farmacológicos en la preparación aislada de CC-NSC de gato también apoyan un papel clave para el ATP en la transmisión sensorial (Iturriaga y Alcayaga, 2004).

Por otra parte, se ha sugerido que la ACh se colibera con ATP en el CC, ya que en la preparación aislada de CC-NSC de gato o rata, los bloqueantes nicotínicos inhiben parcialmente la descarga del NSC (Eyzaguirre y Zapata, 1968; Iturriaga y Alcayaga, 2004; Zhang et al., 2000) y en los co-cultivos se requiere la coaplicación de inhibidores de receptores purinérgicos y nicotínicos para bloquear completamente las respuestas postsinápticas (Nurse, 2010; Zhang et al., 2000).

En conjunto, estos estudios muestran que aún queda por resolver cuál es la naturaleza de ese NT clave en la sinapsis CC-NSC. Dada la colocalización de las enzimas que sintetizan aminas (CA y ACh) en las CQCC, podemos sugerir que no se trata de una única molécula, sino de la acción conjugada de varios NT actuando en concierto con otras sustancias neuromoduladoras.

6. FUNCIÓN DEL CC

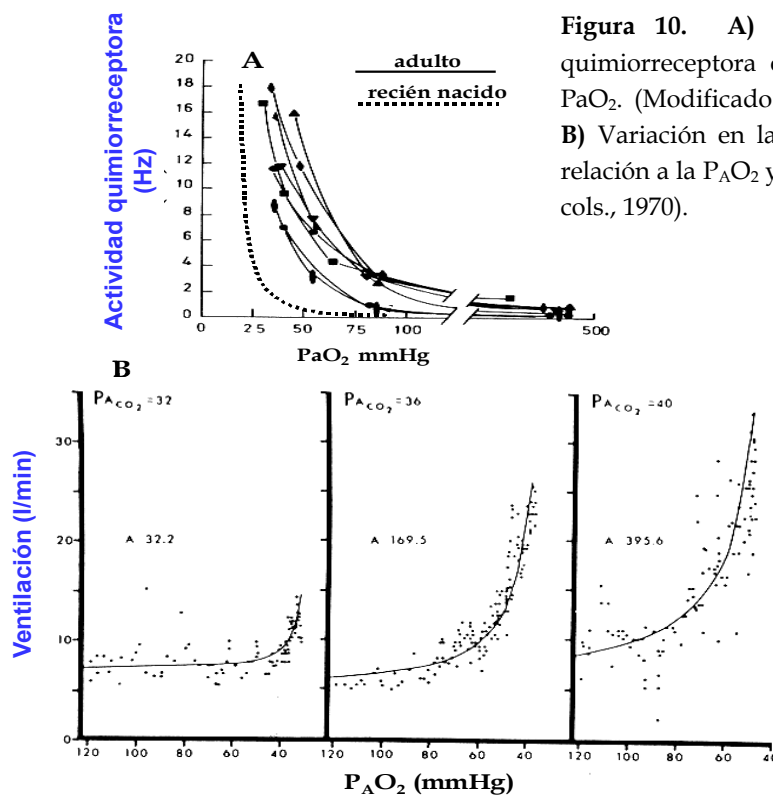
6.1 Respuesta frente a normoxia e hipoxia hipóxica

Efectos sobre la actividad del NSC. En estado normóxico y eucápnico se observan descargas en el NSC de baja frecuencia que oscilan con la respiración, ya que existen oscilaciones ligeras en la PO_2 y PCO_2 alveolar, que se transmiten a la sangre arterial y son detectadas por el CC. Estas oscilaciones en las descargas del NSC contribuyen a la hiperventilación en el ejercicio, donde las amplitudes de las oscilaciones de la PO_2 y PCO_2 son mayores por la mayor diferencia arteriovenosa para estos gases, implicando un aumento en la amplitud de las oscilaciones a nivel arterial y de las descargas del NSC (González et al., 1994).

Por otro lado, y aunque las fibras sensoriales del NSC no tienen un umbral de activación específico para el O_2 , la frecuencia de descarga aumenta de forma lineal al bajar la PaO_2 , entre los 600 y los 70 mmHg. En torno a los 70-75 mmHg hay un cambio brusco de pendiente y el aumento de frecuencia pasa de ser lineal a exponencial, hasta una PaO_2 de 10-15 mmHg (ver **Figura 10A**; ver González et al., 1994). La disminución rápida en la PaO_2 conlleva un aumento de las descargas en el NSC que se inicia en menos de un segundo y alcanza su valor máximo en unos 3 segundos, manteniéndose en ese nivel máximo mientras la PaO_2 permanezca disminuida, sin mostrar una adaptación al estímulo (González et al., 1994). La vuelta a niveles de descarga basales se produce en 2-3 segundos tras el fin de la hipoxia. La falta de adaptación en la respuesta del NSC frente a la hipoxia tiene su importancia fisiológica, puesto que las hipoxias hipóxicas, bien fisiológicas, por residencia a grandes alturas, bien patológicas, por enfermedad pulmonar, son también de carácter sostenido. Durante la HC se produce aclimatación o sensibilización de la respuesta ventilatoria (ver apartado siguiente), que se genera a nivel del CC, pues el registro de la actividad del NSC aumenta progresivamente durante las 5-6 primeras horas de hipoxia (Bisgard, 2000).

Efectos sobre la ventilación. Si de respirar aire se pasa a respirar 100% de O_2 se produce una depresión ventilatoria de entre el 20 y el 30%, por la desactivación del reflejo quimiorreceptor, efecto observado tanto en humanos despiertos como anestesiados. Este test hiperóxico, conocido como *test de Dejours*,

demuestra la contribución del CC en el mantenimiento de la ventilación. Los CC median toda la hiperventilación generada por las hipoxias hipóxicas ya sean fisiológicas o de origen patológico. La relación entre P_{aO_2} y ventilación es similar a la descrita antes entre P_{aO_2} y descargas en el NSC (Weil et al., 1970; **Figura 10B**). En humanos a los que se les extirparon quirúrgicamente los CC (práctica común en los años 50 y 60 para tratar cuadros de asma incoercible) no se encontró hiperventilación en respuesta a la hipoxia. Estos mismos sujetos presentaron una disminución del 30% en su respuesta ventilatoria tras el ejercicio en relación a sujetos controles. Resultados similares obtenidos con animales de experimentación con los NSC seccionados muestran una pérdida total de respuesta frente a hipoxia.



Efectos sobre el aparato cardiovascular. Los efectos son complejos y difieren según la especie animal, intensidad de la hipoxia aplicada y el protocolo experimental, incluyendo si el animal fue anestesiado o no y del tipo y dosis de anestesia. El reflejo quimiorreceptor activado por la hipoxia va a afectar de manera directa a algunos parámetros cardiovasculares, mientras que otros serán afectados por la hiperventilación generada por dicho reflejo, es decir, de modo indirecto.

Cuando todo el animal es sometido a hipoxia, como ocurre de modo natural, si la hipoxia hipóxica es de baja intensidad, se produce un aumento de la contractilidad cardíaca, mientras que para hipoxias más intensas se produce un efecto ionotrópico negativo, con vasodilatación a todos los niveles, excepto a nivel pulmonar donde aparece vasoconstricción. La suma de todos los mecanismos conduce a taquicardia, aumento del gasto cardíaco y vasodilatación periférica. Con hipoxia sostenida el aumento del reflejo quimiorreceptor (aclimatación) disminuye la taquicardia y normaliza el gasto cardíaco frente al consumo total de O₂.

Efectos sobre el sistema endocrino. La hipoxia genera en animales adultos de diversas especies el aumento de la secreción de CA, principalmente adrenalina, que se originan en la médula adrenal, por un mecanismo nervioso reflejo. Esta liberación es mediada por el CC, pues al seccionar el NSC desaparece dicha secreción de CA, y estimulando el NSC se produce liberación de CA adrenales (Fitzgerald y Shirahata, 1997). Este aumento de la secreción de CA estaría relacionado con la hipertensión arterial en situaciones de sensibilización del CC como ocurre en la apnea del sueño (Kumar et al., 2006; González et al., 2012).

6.2 Respuesta frente a hipoxia anémica, histotóxica y de estasis

En situaciones de hipoxia anémica y de estasis compatibles con la vida, no se observa respuesta de los CC, pero los quimiorreceptores aórticos se activan a intensidades moderadas de ambos tipos de hipoxia. Así con disminuciones del hematocrito de hasta el 50% se activan los quimiorreceptores aórticos, mientras que apenas lo hacen los quimiorreceptores carotídeos. En relación a la hipoxia de estasis, se necesita una hipotensión de 80 mmHg para activar el cuerpo aórtico y de 50 mmHg para el CC, que son menos sensibles a los cambios en la capacidad de transporte de O₂ por la sangre. Los CC se comportan como sensores rápidos de los cambios de gases en sangre y son responsables de la respuesta refleja ventilatoria frente a hipoxia. Los cuerpos aórticos son los principales sensores del flujo circulatorio y de la capacidad de transporte del O₂ por la sangre, siendo los principales responsables de las respuestas reflejas circulatorias. Se produce taquicardia, aumento del gasto cardíaco y menor presión arterial, efectos todos ellos encaminados a prevenir la hipoxia tisular. Por otro lado, los efectos

ventilatorios de la estimulación de los cuerpos aórticos, y por tanto de la hipoxia anémica y de estasis son despreciables (González et al., 1994; Kumar, 2009).

6.3 Respuesta frente a hipercapnia y acidosis

Ante la aplicación de un aumento brusco en la presión de dióxido de carbono arterial (PaCO_2) se incrementa rápidamente la frecuencia de descargas en el NSC, alcanzando su valor máximo en 2 segundos y adaptándose a niveles más bajos en menos de un minuto (McCloskey, 1968). La frecuencia de descargas del NSC aumenta de modo lineal en el rango que va entre 20 y 80 mmHg de PaCO_2 , aumentando la pendiente a medida que disminuye la PO_2 , por potenciación de la respuesta entre ambos estímulos (ver **Figura 11**).

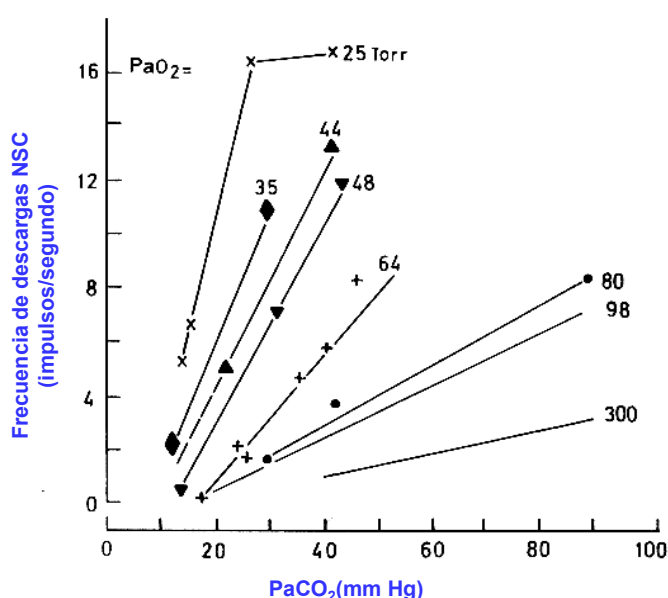


Figura 11. Relación de la actividad del NSC en función de la PaCO_2 y para una PaO_2 dada. Se observa que la pendiente de las curvas aumenta a medida que disminuye la PO_2 , lo que define una interacción positiva entre el estímulo hipercápnico y el hipóxico (Tomado de Lahiri y Delaney, 1976).

La relación de ventilación es similar a la de las descargas, pero en ésta no influyen sólo los CC, sino también los quimiorreceptores centrales. Así pues, al denervar los CC, se puede determinar la contribución de cada uno de los quimiorreceptores a la respuesta ventilatoria. Los CC tienen un umbral para el estímulo ácido más bajo que los quimiorreceptores centrales y por tanto la hiperventilación que se produce en respuesta a una acidosis respiratoria moderada se origina fundamentalmente en ellos. En acidosis respiratorias más intensas los CC contribuyen en un 30-40% a la respuesta hiperventilatoria y el resto de la contribución se debe a los quimiorreceptores centrales. Ante una acidosis

metabólica, la contribución de los CC es mayor principalmente en sus primeras etapas, puesto que los H^+ atraviesan mal la barrera hematoencefálica y tienen dificultad para alcanzar a los quimiorreceptores centrales y ejercer sus efectos sobre ellos (Irsigler et al., 1980). La $PaCO_2$ y la PCO_2 del líquido cefalorraquídeo disminuyen por la hiperventilación originada en el CC. Tras varios días de acidosis el pH del líquido cefalorraquídeo se equilibra con el de la sangre, estimulándose así tanto los quimiorreceptores centrales como los periféricos (Cherniack y Altose, 1987). En acidosis, como en la hipoxia hipóxica, la contribución de los cuerpos aórticos es nula, pues mientras que la sección de los NSC en gato reduce un 30-40% la ventilación producida por la acidosis respiratoria, la sección de los nervios vagos, encargados de inervar los cuerpos aórticos, no modifica la respuesta ventilatoria (Berkenbosch et al., 1979 a, b). Sobre el aparato cardiovascular, los efectos de la hipercapnia, son comparables a los de la hipoxia y son igualmente producidos por mecanismos directos e indirectos.

6.4 Respuesta frente al ejercicio

Cuando se trabaja por debajo del umbral anaeróbico la ventilación aumenta en proporción a la intensidad del ejercicio y en relación al consumo de O_2 y la producción de CO_2 , a pesar de que se mantienen la PaO_2 , $PaCO_2$ y el pH plasmático. Cuando se supera este umbral, la ventilación aumenta sin guardar proporción con la intensidad del ejercicio, aparece una acidosis metabólica, se produce una hipocapnia y una tendencia al aumento de la PaO_2 por la hiperventilación resultante. En condiciones subanaeróbicas la contribución del CC a la hiperventilación es $\approx 30\%$, porcentaje que aumenta al pasar a situaciones anaeróbicas, por la acidosis metabólica, que activa al CC. La extirpación bilateral del CC produce hipoventilación relativa (disminución del 30%).

Una vez demostrado que el CC participa en la respuesta hiperventilatoria ante el ejercicio moderado a pesar del mantenimiento de la PaO_2 , la $PaCO_2$ y el pH en esta situación, nos preguntaríamos qué estímulos son los que activan a los CC. Según hemos visto, el aumento de la amplitud y frecuencia de las oscilaciones de los gases sanguíneos que ocurren en el ejercicio contribuirían a la hiperventilación. Otro factor importante sería el aumento de la potasemia producido por la liberación de K^+

en los músculos activos, lo que aumenta la frecuencia media de descargas del NSC y la amplitud de su oscilación respiratoria, así como las CA plasmáticas que aumentan durante el ejercicio y también activan al CC. Por último, durante el ejercicio se produce un incremento de la T^a corporal que aumentaría la sensibilidad del CC (ver Zapata, 1997) que también mantendría la hiperventilación. En situaciones de ejercicio intenso, por lo tanto, se produciría una intensa acidosis metabólica, lo que junto a otros factores ya descritos, es la causa de la gran hiperventilación originada en el CC (Rausch et al., 1991; Wasserman et al., 1975; Whipp, 1983).

6.5 Respuesta frente a otros factores (Temperatura, Osmolaridad y Glucosa)

En preparaciones *in vitro*, en las que se modificó la T^a del baño, se estudió la termosensibilidad del CC y se observó que el aumento de la T^a producía incrementos en la frecuencia de descarga del NSC (Gallego et al., 1979). Resultados similares se han observado *in vivo* (Fadic et al., 1991) y la sección del NSC abolía el efecto de la hipertermia sobre la ventilación. Todos estos hechos, en conjunto, demuestran la termosensibilidad del CC y su influencia en la hiperventilación que aparece durante el ejercicio y en los cuadros febriles.

Existen datos en la literatura que sugieren que el CC podría contribuir al control de la osmolaridad de los líquidos corporales. Sin embargo no poseemos una visión integrada entre las respuestas de las CQ y las descargas en el NSC y los efectos sobre la función renal (Fitzgerald y Shirahata, 1997; Zapata, 1997).

En cuanto a los niveles de glucosa se ha demostrado, en animal intacto, que la activación de los CC segrega de forma refleja hormona antidiurética (ADH) y CA, que participan en la génesis refleja de una respuesta hiperglucemiante (Álvarez-Buylla et al., 1997; Montero et al., 2003). De igual modo, la ausencia de glucosa en el líquido de superfusión de CQ aisladas, produce inhibición de corrientes de K⁺ y aumento de la resistencia de entrada comparable a la observada con la hipoxia (Pardal y López-Barneo, 2002). Sin embargo, Zhang et al. (2007), que coinciden en que una baja concentración de glucosa despolariza las CQ, encuentran que la disminución de la glucosa produce una caída de la resistencia de entrada. En otro sentido van los hallazgos del laboratorio de Kumar (Bin-Jaliah et al., 2004, 2005), donde empleando como estímulo la hipoglucemia inducida por insulina,

encuentran que se produce un aumento de la ventilación mediada por el CC. Como la hipoglucemia *in vitro* no aumenta las descargas en el NSC, estos efectos sobre la ventilación se deberían principalmente a un incremento metabólico regulado por un factor aún no identificado, pero que deben ser componentes de la respuesta hormonal contra-reguladora que la hipoglucemia produce (aumento de CA, ADH, angiotensina, hormona adrenocorticotropa (ACTH) - cortisol). Datos antiguos (Almaraz et al., 1984) y recientes (Conde et al., 2007; Gallego-Martin et al., 2012) de nuestro laboratorio indican que las CQ en CC intactos no se activan en hipoglucemia ni siquiera en 0 mM de glucosa.

6.6 Ajustes del CC con la edad

En el hombre y en la generalidad de los animales al nacer, el CC-reflejo quimiorreceptor no es funcional, o lo es mínimamente, siendo incapaces de generar respuestas ventilatorias o si generan alguna ventilación, ésta es escasa y habitualmente bifásica. Al proceso global de maduración del CC-reflejo quimiorreceptor se le conoce como “*resetting*” (ajuste) de la función quimiorreceptora (ver Carroll y Kim, 2013; Donnelly, 1997) y aunque no se conocen los mecanismos íntimos, sí que se sabe que el desarrollo en una atmósfera adecuada es vital. Así, la hipoxia en periodo perinatal conlleva a un mantenimiento durante meses del carácter bifásico (aumento seguido de depresión) de la respuesta ventilatoria a la hipoxia, mientras que en animales controles la maduración se consigue en 2-4 semanas (Hanson y Kumar, 1994). Si en lugar de hipoxia se somete a los animales a hiperoxia (30-60% O₂) durante el periodo perinatal, también resulta afectada la funcionalidad del CC en los animales adultos. Según describimos en la sección de VPH, la hiperoxia perinatal produce hipotrofia del CC y alteraciones en la capacidad para responder a la hipoxia que son apreciadas de forma distinta según laboratorios (Bavis et al., 2013; Fuller et al., 2002; Ling et al., 1997 a, b, c; Prieto-Lloret et al., 2004). Se ha estudiado también el patrón respiratorio de cerdos despiertos de menos de 9 días con denervación carotídea, denervación combinada aórtica-carotídea y animales controles (ver Donnelly, 1997). Los grupos con denervación, hipoventilaban en normoxia, presentaban mayor número de apneas espontáneas y una mortalidad aumentada respecto a los controles. Esto demuestra

que los quimiorreceptores periféricos (sobre todo el CC) mantienen la ventilación y previenen las apneas, y su papel es crítico en la supervivencia en periodos postnatales. Anomalías del CC serían un factor clave en la génesis del síndrome de la muerte súbita del recién nacido (Gauda et al., 2007).

En edades avanzadas en el hombre, hay disminución de la PaO_2 y de la capacidad ventilatoria máxima (Knapowski et al., 2002; Sorbini et al., 1968) y alteración de la respuesta ventilatoria a hipoxia e hipercapnia (Behan et al., 2002; Chan y Welsh, 1998). En experimentos de nuestro laboratorio (Conde et al., 2006 a) se ha observado que la funcionalidad del CC disminuye marcadamente en ratas de 18 y 24 meses de edad (≈ 60 y 80 años humanos) tanto si se evalúa sobre la dinámica de los NT de las CQ como a nivel de actividad en el nervio del seno.

6.7 Ajustes del CC con la hipoxia sostenida

La hipoxia mantenida en animales adultos desencadena hiperventilación y en consecuencia alcalosis respiratoria. Es lo que ocurre en alturas elevadas, pudiéndose simular este efecto con la ayuda de cámaras hipobáricas o con poco O_2 . A la hora de estudiar la hipoxia sostenida se distingue entre hipoxia de corta duración (hora(s)), de larga duración (días, semanas, meses o años) y la hipoxia de residentes de muchos años o nativos de poblaciones a gran altitud. Con hipoxias sostenidas encontramos aumento progresivo de la respuesta ventilatoria a la hipoxia junto a una disminución progresiva de la $PaCO_2$, en un proceso que se conoce como aclimatación a grandes alturas, cuyo curso temporal depende de la intensidad de la hipoxia y de la especie animal. Estudios realizados en cabras, con los CC perfundidos con sangre hipóxica, mientras el resto de la sangre era normóxica, han permitido demostrar que la aclimatación a la hipoxia depende de modo exclusivo del CC y no de la PaO_2 y $PaCO_2$ sistémicas (Bisgard, 2000). En nuestro laboratorio hemos observado que una semana de hipoxia sostenida en rata (equivalente a ≈ 4.500 m sobre el nivel del mar) produce un aumento marcado de la respuesta a test de hipoxia aguda (Cáceres, 2007, Tesis Doctoral). En niños nacidos a grandes alturas no se observan diferencias en la ventilación, si bien, la respuesta a la hipoxia está atenuada, o incluso ausente, salvo si se les somete a una hipoxia muy intensa (Monge y Leon-Velarde, 1991).

Cabe destacar también que la exposición a HC o de larga duración en animales adultos produce una hiperplasia de los CC, cuyo peso llega a duplicarse o incluso más en ratas tras un periodo de 2-4 semanas de HC (Laidler y Kay, 1975; Cáceres et al., 2007; Conde et al., 2012 a). Este aumento es debido principalmente al crecimiento de nuevos vasos. Se observa también un aumento en el contenido de DA, que de acuerdo con algunos autores llegaría a ser hasta 15 veces el valor control al cabo de 4 semanas de hipoxia en la rata (Hanbauer et al., 1981) pero que en nuestro laboratorio a los 8 y 15 días de hipoxia (Cáceres, 2007; González-Martin, 2008, Tesis Doctorales) representan un aumento por un factor de 2 a 3 que se correlaciona con aumentos en la expresión de TH (Cáceres, 2007, Tesis Doctoral). En estos periodos de aclimatación, se observan cambios en la expresión de isoformas y subunidades de NADPH oxidasa (He et al., 2010) aumento de la expresión de canales de Na⁺ voltaje dependientes (Cáceres et al., 2007), cambios en la expresión de canales de K⁺ y de sus subunidades (Cáceres et al., 2007) y cambios en la dinámica de los NT (Conde et al., 2012 a).

En esta última década han ido apareciendo una serie de estudios que han culminado con la demostración de que los mediadores de la inflamación participan en la sensibilización del CC que ocurre en la HC (ver Liu et al., 2013 para referencias).

7. MECANISMOS CELULARES DEL CC

La organización estructural del CC descrita previamente nos va a permitir definir el acoplamiento funcional entre todos sus elementos. Los capilares, cercanos a las CQ, minimizan el espacio de difusión entre la sangre y las células, para que estas últimas puedan detectar de forma rápida variaciones en la presión arterial de O₂, CO₂ y pH (DETECCIÓN), dando lugar a una modificación en la liberación de los NT contenidos en las vesículas (TRANSDUCCIÓN) que generan cambios en la frecuencia de los potenciales de acción (PA) en las fibras quimiorreceptoras del NSC (TRANSMISIÓN). La modificación en la frecuencia de los PA del NSC se integra en el tronco del encéfalo. De allí parten las órdenes a los aparatos

respiratorio y cardiovascular (EFECTORES), que modifican su función para corregir la alteración detectada por los CC (**Figura 12**).

En esta sección estudiaremos: **1/** los estímulos naturales del CC y sus mecanismos de detección, incluida la secreción de NT que es la respuesta más integrada de las CQ y **2/** el acoplamiento entre las CQ y las terminaciones del NSC que constituye la etapa de neurotransmisión propiamente dicha.

En un sentido amplio la transducción es la transformación de un tipo de señal en otro. En los receptores sensoriales secundarios existen dos etapas:

- Transducción. Es la transformación de la energía del estímulo en respuesta secretora, con liberación de NT.
- Transmisión. Es la transformación de la señal química de los NT en señal eléctrica en las neuronas sensoriales.

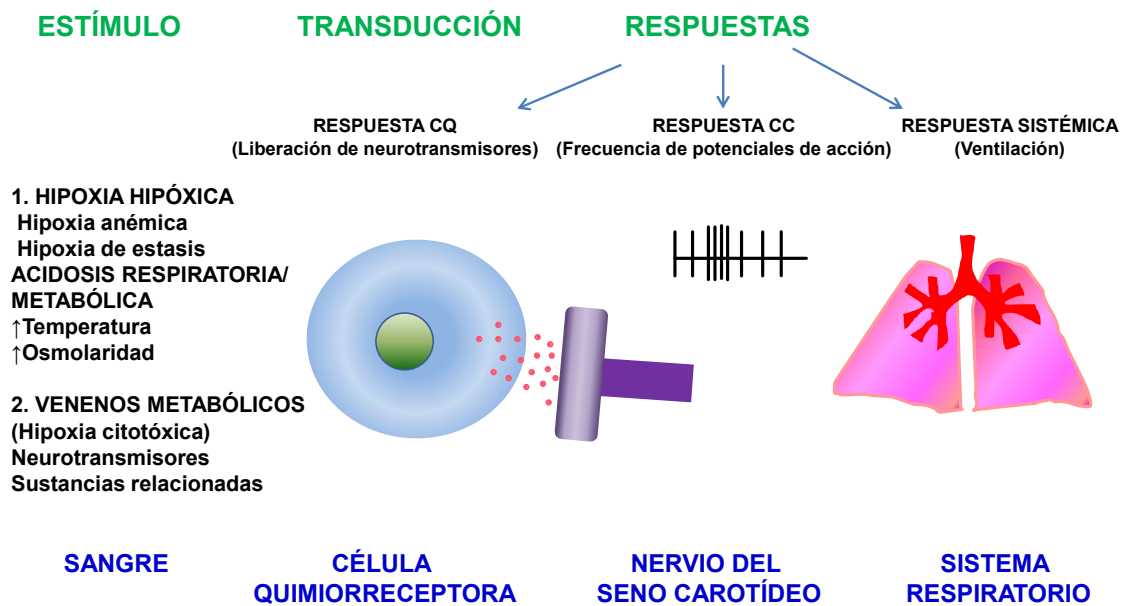


Figura 12. Etapas de la transducción sensorial CC-NSC. Representación esquemática de la respuesta de los quimiorreceptores del CC frente a estímulos hipóxicos, ácidos y venenos metabólicos a 3 niveles: CQ (con liberación de NT), NSC (con activación de PA) y sistémica (con cambios en la ventilación). (Modificado de González et al., 1994).

DetECCIÓN y transducción de estímulos

A las presiones de gases y pH sanguíneos normales, las CQ poseen una actividad basal, que puede medirse como liberación basal de NT *in vitro*, o como actividad eléctrica en el NSC tanto *in vivo* como *in vitro*. Esta actividad basal ejerce

un papel importante sobre la ventilación: la sección de los NSC disminuye la ventilación y aumenta la PaCO₂ de 8-10 mmHg. El umbral fisiológico para la hipoxia se corresponde con una PaO₂ de 70-75 mmHg, valor a partir de la cual, la pendiente entre la PO₂ y las descargas en el NSC aumenta de forma exponencial.

7.1 Hipoxia Hipóxica

Diversas hipótesis han intentado explicar el funcionamiento del CC. Nuestro laboratorio ha estudiado estos mecanismos y ha elaborado una de las hipótesis que posteriormente comentaremos.

En los años 70 se demostró que las CQ liberaban DA en respuesta a la hipoxia (González y Fidone, 1977; Fidone et al., 1982 a, b) y se empezó a considerar la transducción hipóxica en dichas células como un fenómeno de acoplamiento estímulo-secreción. Los estudios posteriores se encaminaron a la demostración de la universalidad de la secreción de DA ante la hipoxia. Así, en CC de conejo, gato, rata, ratón y ternera se observó liberación de DA, de modo Ca²⁺ dependiente, en respuesta a hipoxia e hipercapnia y en proporción a la intensidad del estímulo (Obeso et al., 1985, 1986; Rigual et al., 1984, 1986, 2002; Rocher et al., 1991; Sanz-Alfayate et al., 2001; Vicario et al., 2000 a) mientras que el alto K⁺_e (estímulo despolarizante) provocaba idéntico efecto (Almaraz et al., 1986).

También se demostró que la liberación inducida por alto K⁺_e e hipoxia era sensible a dihidropiridinas (agonistas y antagonistas de los canales de Ca²⁺ voltaje dependientes (VOCC), tipo L), mientras que la liberación inducida por un estímulo ácido, aunque también dependiente de Ca²⁺, no resultaba afectada por estas drogas (Obeso et al., 1992) implicando otras vías de entrada de Ca²⁺ en las CQ. Simultáneamente se demostró (Rocher et al., 1988, 1991, 1994) que la veratridina, activador de los canales de Na⁺ dependientes de voltaje, aumentaba la liberación de DA de modo dependiente de Na⁺ y Ca²⁺ y era sensible a tetrodotoxina (TTX). Estos resultados son compatibles con que la hipoxia despolarice las CQ y provoque la entrada de Na⁺.

Tras poner a punto una preparación de CQ en cultivo primario (Pérez-García et al., 1992) y en colaboración con el grupo de López-Barneo de la Universidad de Sevilla, se inició un estudio electrofisiológico con técnicas de *patch-clamp* que sirvió para descubrir la existencia de corrientes de K^+ , sensibles a la PO_2 y que se inhibían con la hipoxia. De igual modo se confirmó la existencia de canales de Na^+ y Ca^{2+} voltaje dependientes (López-Barneo et al., 1988; López-López et al., 1989).

A partir de estas observaciones se propuso el modelo de transducción del estímulo hipóxico conocido con el nombre de: *Modelo de membrana de la transducción hipóxica* (**Figura 13**; González et al., 1992). Aunque este modelo en líneas generales todavía sigue vigente, existen varios aspectos que aún no han quedado resueltos:

- A. ¿Cómo detectan las CQ la PO_2 , cuál es el mecanismo sensor de O_2 ?
- B. ¿Cómo se acopla el mecanismo que detecta la PO_2 y los canales de K^+ que van a participar en la despolarización de las CQ?
- C. ¿Cuál es la identidad molecular de los canales de K^+ sensibles a la PO_2 que se encuentran implicados en la respuesta a la hipoxia?

En los párrafos que siguen, dedicados a sensores de O_2 , trataremos de dar contestación de forma ensamblada a las tres preguntas, de la misma manera que lo hicimos en el caso de la VPH.

7.1.1 Sensor(es) de O_2

Ward y cols. (2008; ver también Evans y Ward, 2009) distinguen dos mecanismos genéricos en los posibles sensores de O_2 : bioenergéticos y biosintéticos. Los primeros señalarían perturbaciones de la función mitocondrial y del estado energético y los segundos, perturbaciones de la síntesis o degradación O_2 -dependientes de moléculas, p.ej., señalarían la concentración de un metabolito cuya síntesis o degradación requiere O_2 ; sin embargo, tal y como Ward indica, en algunos casos esta distinción puede desdibujarse. A estas dos categorías añadiríamos un tercer mecanismo genérico que llamaremos conformacional (González et al., 2010). Desde nuestro punto de vista, los sensores de O_2 conformacionales señalarían la hipoxia como una reorganización molecular

alostérica interna, que se transmite al siguiente (primer) elemento de la cascada de transducción. En la **Figura 13** se muestra a la izquierda, un diagrama de flujo de la cascada de transducción para la quimiorrecepción de O_2 como el que propuso nuestro laboratorio en 1992. Aparecen marcados con un círculo tanto el sensor de O_2 como los mecanismos de acoplamiento y ligado a ellos, por flechas gruesas, las tres categorías genéricas de los supuestos sensores de O_2 para la detección de la hipoxia aguda en las CQCC.

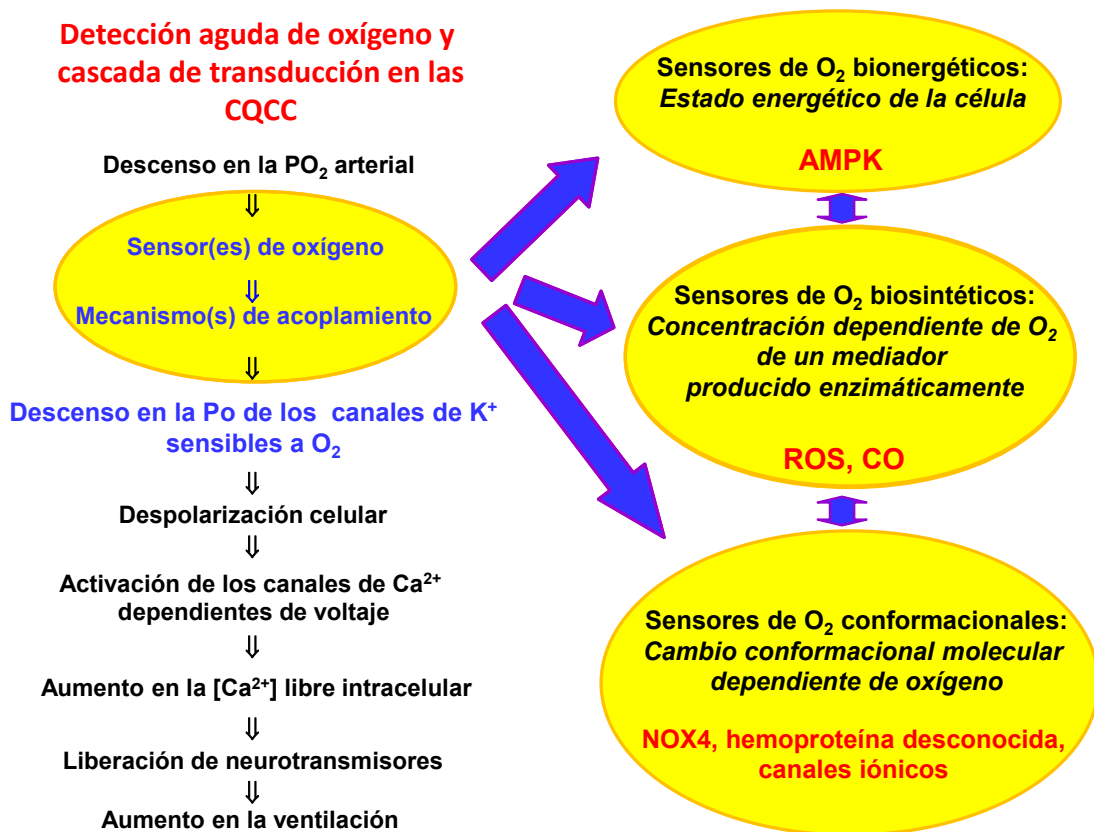


Figura 13. Cascada de transducción hipóxica y posible naturaleza de los sensores de O_2 (ver texto para las explicaciones). (Modificado de González et al., 2010).

7.1.1.2 Sensores de O_2 bioenergéticos

Como ya hemos discutido en la sección de VPH, en condiciones de estado estacionario, el funcionamiento combinado del sistema respiratorio (ventilación) y del sistema cardiovascular asegura el suministro adecuado de O_2 a toda la población de células que componen los organismos de los mamíferos complejos. En estas condiciones, la cantidad de O_2 suministrada a cada célula proporciona una tasa adecuada para asegurar la síntesis de ATP, de modo que éstas puedan

mantener su homeostasis, sus procesos biosintéticos, así como para llevar a cabo en células especializadas, el trabajo externo. Incluso en un organismo mamífero en reposo, los requerimientos de O_2 (ATP) varían enormemente, existiendo células con una elevada tasa de consumo de O_2 (por ejemplo, neuronas) y otras con demandas energéticas mucho más bajas (por ejemplo, los adipocitos).

El diseño general del sistema cardiovascular hace frente a estas diferencias de las necesidades metabólicas en reposo proporcionando a cada tejido-órgano una red vascular, de densidad proporcional a las mismas (Borowsky y Collins, 1989; Obeso et al., 1997). Sin embargo, tal y como se muestra en las células de músculo esquelético o en los enterocitos, la demanda de energía de las células varía de acuerdo con su grado de actividad. Así, el diseño debe cumplir con estas variaciones dinámicas en los requerimientos energéticos. La AMPK, según hemos visto ya, es una enzima que en situaciones en las que los niveles de ATP tienden a disminuir, activa múltiples rutas metabólicas encaminadas a promover la síntesis de ATP y a inhibir rutas que consumen ATP (Hardie, 2008). Esta enzima se activa al aumentar los niveles de AMP en las células (o disminuye el cociente ATP/AMP; ver en VPH). Nuestro interés en este contexto se centra en cuáles son los efectos que resultan de la activación de la AMPK como resultado de una *crisis metabólica* producida por la hipoxia aguda y si estos efectos deben ser considerados como mediadores de detección de O_2 y/o parte de la cascada de transducción en las CQCC. Pensamos que no: el CC es capaz de mantener respuestas a la hipoxia a PO_2 muy bajas, prácticamente incompatibles con la vida y la sensibilidad a la hipoxia está en un rango en el que no se puede hablar de crisis metabólica.

Sin embargo, el laboratorio del Prof. Mark Evans sigue postulando a la AMPK como el sensor de O_2 . En este sentido hay que señalar que Wyatt et al. (2007) encontraron que en ratas neonatales, la AMPK co-localiza en la membrana plasmática de las CQ con maxi-K, y que el activador de AMPK, AICAR, inhibía las corrientes sensibles a O_2 expresadas en estas células, corrientes mediadas tanto por canales tipo TASK como maxi-K, causando la despolarización de las CQ y aumentando la actividad aferente en el NSC. En un estudio más reciente de Dallas et al. (2009), utilizando canales recombinantes TASK, se mostró que la isoforma

sensible a AICAR es TASK-3, un hecho que ha sido recientemente confirmado por otros autores (Kim et al., 2009, 2011) indicando que la principal corriente sensible a O_2 en las CQCC de rata está constituida principalmente por canales heteroméricos TASK-1/TASK-3. En el estudio de Wyatt y cols. (2007), también se mostró que el antagonista de AMPK (compuesto C) revertía los efectos descritos anteriormente de la hipoxia y de AICAR en las CQ. Sin embargo, desde cierto punto de vista, puede decirse que la mayoría de los efectos vistos sobre la activación y la inhibición de la AMPK son epifenoménicos a la detección de O_2 , porque la inhibición de maxi-K (Gómez-Niño et al., 2009 b) y la eliminación genética de TASK-1 y TASK-3 no afectan al comportamiento hipóxico de las CQ (Turner y Buckler, 2013). Debe señalarse sin ambigüedad que los datos generados por Wyatt y cols. (2007) podrían indicar que la fosforilación de los canales de K^+ dependiente de AMPK, en las CQ del CC, mimetiza la hipoxia y parece ser capaz de desencadenar actividad aferente del CC integrada, apoyando la idea de que la activación de AMPK es un elemento clave en la cascada de transducción hipóxica. Pero la cuestión a debate es si la AMPK es el sensor primario de la PO_2 o si es un elemento amplificador en la cascada de transducción hipóxica que fosforilando canales aumenta su sensibilidad a la hipoxia. Pensamos que la AMPK no es el sensor primario. Varios laboratorios utilizando CQ de conejo y rata para registrar corrientes de K^+ sensibles a la hipoxia, así como canales en parches de membrana aislados en configuración *inside out*, han evidenciado que la sensibilidad al O_2 de las CQ es un proceso delimitado a la membrana que no requiere la participación de ningún tipo de sustrato metabólico particular ni de ninguna reacción enzimática. Estas observaciones también se han ampliado a canales recombinantes expresados en sistemas heterólogos (ver más adelante).

7.1.1.3 Sensores de O_2 biosintéticos

Aquí nos estamos refiriendo a los sensores basados en la medida de la $[O_2]$ dependientes de mediadores producidos enzimáticamente tales como las ROS y el CO. En los últimos años (ver González y cols., 2007 vs. González y cols., 2010) ha habido cambios sustanciales en el campo de las ROS dentro de la quimiorrecepción

del O₂ en el CC, tanto en relación con las ROS mitocondriales como en las ROS derivados de la NADPH oxidasa.

ROS mitocondriales

La literatura sobre la detección aguda de O₂ y las ROS mitocondriales ha estado dominada durante casi una década por puntos de vista opuestos en su significado, la mayoría centrados en la VPH, pero incluyendo la quimiorrecepción del O₂ en el CC (ver Evans et al., 2011; Evans y Ward, 2009). Por un lado, el laboratorio de Schumacker proponía que la hipoxia era el desencadenante de un aumento en la producción de ROS en el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial (ver VPH sección 3, apartado 2). El punto de vista opuesto lo lideraba el laboratorio de Archer (revisiones representativas: Archer et al., 2008; Weir y Archer, 2010). En uno de sus artículos, Weir y Archer concluían: “en las CMLAP, al igual que en las CQCC, la hipoxia causa una reducción en todas las corrientes de potasio (IK⁺) de la célula... es probable que las IK⁺ estén controladas por cambios en el estado redox, lo cual reflejaría el nivel de la generación de ROS por la mitocondria o por una oxidasa como la NAD(P)H oxidasa”. Estos autores también proponen que los canales de K⁺ estarían cerrados cuando estuvieran en su forma reducida (R-SH SH-R) y abiertos cuando estuvieran oxidados (R-S-S-R).

El posible significado de las ROS mitocondriales en la VPH y por extensión en la quimiorrecepción en el CC, no ha conseguido aclarar estos dos puntos de vista opuestos. En un estudio reciente del grupo de Schumacker (Waypa et al., 2010) basándose en datos obtenidos dentro de compartimentos celulares utilizando indicadores de ROS, proponen que la hipoxia (superfusión de CMLAP aisladas con soluciones equilibradas con un 1.5% de O₂) aumenta las ROS en el espacio intermembrana mitocondrial y por difusión en el citoplasma de la célula, mientras que reduce los niveles de ROS de la matriz mitocondrial; por tanto sería el aumento de los niveles de ROS citoplasmáticas lo que desencadenaría la VPH. En nuestra opinión, los bajos cursos temporales de los cambios en las ROS medidos por Waypa y cols. (2010; ver también Schumacker, 2011) no se correlacionan con la contracción rápida o las corrientes de Ca²⁺ de las CMLAP en respuesta a la hipoxia observadas tanto en preparaciones *in vivo* como *in vitro* (Evans y Ward, 2009), ni en las CQ (Gómez-Niño et al., 2009 a, b; Sánchez et al., 2002). Adicionalmente, Waypa

y cols. observaron que las CML de las arterias sistémicas se comportaban de igual modo que las CMLAP.

Hace relativamente poco tiempo, tal y como hemos comentado en el apartado de la VPH, otros autores proponen la participación de las ROS de ambos orígenes, tanto mitocondriales como derivadas de la NADPH oxidasa (Frazziano et al., 2011). En nuestro laboratorio hemos probado una gran variedad de agentes reductores y oxidantes (Agapito et al., 2009; Gómez-Niño et al., 2009 a; González et al., 2004 a, b; Sanz-Alfayate et al., 2001) y no hemos podido establecer una correlación entre el estado redox general de la célula y la actividad de las CQ. Por tanto, si en el caso de las CMLAP, el papel de las ROS parece ser aceptado por un gran número de investigadores (ver Sylvester et al., 2012) tendríamos que añadir que la cascada de transducción hipóxica no es común para las CMLAP y las CQ. De hecho los datos de la **Figura 14** muestran los resultados tan diferentes que produce el inhibidor de la esfingomielinasa neutra, GW4869, a la misma concentración (10 μ M), disminuyendo aproximadamente en un 80%, la tensión desarrollada por los segmentos de AP en respuesta a la hipoxia sin alterar la actividad de las CQ.

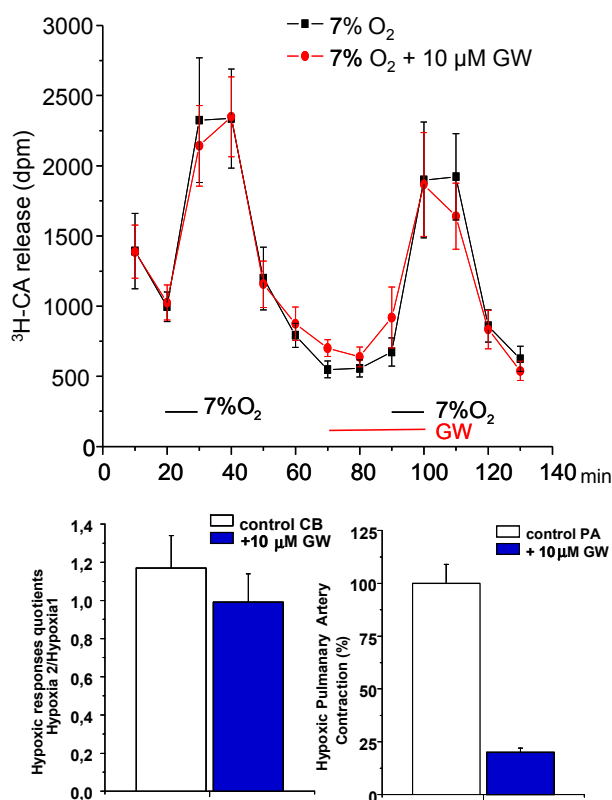


Figura 14. Efectos del GW4869, un inhibidor específico de la esfingomielinasa neutra, sobre la actividad de las CQ en normoxia e hipoxia. La actividad de las CQ fue medida en base a su liberación de ^3H -CA. En un grupo de 10 CC, 2 estímulos hipóxicos (10 min de superfusión con una solución equilibrada con 7% O_2 en lugar de la solución normóxica con 20% O_2) y otro grupo similar de 10 CC que fue estimulado de igual modo, pero antes y durante la aplicación del segundo estímulo hipóxico, también estaba presente GW4869 10 μM . En la parte superior de la figura se muestra el curso temporal medio de la liberación evidenciando que la presencia del inhibidor de la esfingomielinasa neutra no la alteraba. En la línea inferior de la figura a la izquierda se muestran los cocientes de la liberación evocada del segundo estímulo con respecto al primero tanto en órganos controles como en los tratados con el inhibidor. Para propósitos comparativos se muestran los efectos medios de la misma [GW4869] sobre la contracción de anillos de AP. (Estos datos están tomados de Cogolludo et al., 2009).

No queremos terminar este apartado sin hacer algunas consideraciones finales. Primera, los métodos utilizados para evaluar las concentraciones de las ROS o el estado redox no son fiables (ver Jelic y Le Jemtel, 2008). Segundo, las conclusiones basadas en el uso de antioxidantes deben ser muy cautelosas ya que los antioxidantes pueden tener efectos secundarios conocidos o no (Sekiguchi et al., 2003) y además si los antioxidantes son realmente efectivos es muy posible que estén produciendo la reducción de moléculas que deberían estar oxidadas, con lo que el resultado obtenido puede ser artefactual (Armitage et al., 2009). Tercero, la compartimentalización de la generación de ROS y la probabilidad de una señalización localizada (ver Lassegue y Griendling, 2010) requiere que en los próximos años se desarrollen indicadores específicos para los compartimentos celulares que sean seguros y fiables para estudiar las diferentes ROS y para entender de una forma correcta el significado de las mismas. En cuarto lugar, debido a la expresión en la mitocondria de superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx) así como a su contenido en ácido lipoico (AL) y glutatión, se llega de forma casi forzada a la conclusión teleológica de que la mitocondria es capaz de producir ROS como ya ha sido probado en una gran variedad de condiciones.

La pregunta correcta, tal y como señalaron Nohl y cols. (2005), sería cuántas ROS mitocondriales se producen en condiciones fisiológicas teniendo en cuenta que la velocidad fisiológica de producción de ROS es mínima y que el fuerte arsenal anti-ROS que posee la mitocondria debe ser considerado como una reserva funcional para luchar contra las ROS en condiciones fisiopatológicas. En este contexto cabría preguntarse cuántas ROS mitocondriales se producirían en situación de hipoxia fisiológica, tanto en las CQ del CC como en las CMLAP.

En suma, creemos que el modelo de las ROS tanto en CQ como en CMLAP posee todavía problemas metodológicos que aún no han sido resueltos y que impiden su exclusión o su implicación.

ROS derivados de la NADPH oxidasa

En los últimos años han emergido numerosos aspectos nuevos sobre la biología de las NADPH oxidasas, NOX, que están recopilados de forma excelente en revisiones recientes (Lassegue y Griendling, 2010). Aquí resumiremos las bases

necesarias para seguir los últimos avances en el campo de la NADPH oxidasa en la quimiorrecepción en el CC.

1. Se han descrito varias isoformas de NOX (NOX1-5, DUOX1 y DUOX2).
2. Un determinado tipo de célula puede expresar varias isoformas de NOX, dando lugar a la posibilidad de que diferentes procesos celulares estén regulados por señales que modulen la actividad de diferentes NOX.
3. La localización celular de NOX es variable, siendo la membrana plasmática y el retículo endoplasmático los sitios más frecuentes; otras localizaciones comunes y específicas para la expresión de NOX incluyen el núcleo y endosomas resultantes de la endocitosis temprana mediada por receptor, lo que genera compartimentos vesiculares especializados, redoxomas donde se generan las ROS ($O_2^{\bullet-}$).
4. El concepto clásico de la NADPH oxidasa como un complejo multimolecular no ensamblado que requiere ser estimulado para su ensamblaje y activación, sigue siendo cierto para NOX1 (ubicua, pero con gran expresión en CML vasculares y endoteliales y por lo tanto juega un papel crítico en la fisiopatología vascular y en el epitelio intestinal donde su función es esencialmente defensiva), NOX2 (la isoforma fagocítica clásica también se expresa en muchos tipos celulares) y NOX3 (expresada en el oído interno donde ha sido relacionada con la función auditiva y la función vestibular y también en pulmón donde se relaciona con el desarrollo del enfisema mediante el control de la destrucción de las fibras elásticas de la pared alveolar). La isoforma NOX4 solo requiere la subunidad $p22^{phox}$ para expresar completamente su actividad. NOX4 fue descrita originalmente como Renox, siendo muy abundante en el riñón donde fue propuesta como el sensor de O_2 capaz de controlar la producción de EPO (Geiszt et al., 2000). NOX5 está compuesta por la subunidad NOX sólo con su región N-terminal siendo muy rica en dominios de unión a Ca^{2+} tipo manos-EF; se expresa en tejido linfático, células vasculares y próstata y parece participar en el control de la proliferación celular, pero hay que señalar que no se expresa en roedores. La activación de DUOX1 y DUOX2 implica la unión de Ca^{2+} a los dominios de manos- EF en el citosol generando directamente H_2O_2 mediante la reducción de 2 electrones del O_2 molecular sin el paso intermedio de la formación de $O_2^{\bullet-}$. Estos 2 tipos se expresan en células tiroideas donde son fundamentales para el metabolismo del yodo y la síntesis de la hormona tiroidea.

5. Los hechos resumidos arriba y referentes a descubrimientos recientes, proporcionan una explicación al postulado propuesto por Saran y Bors (1994; ver también González et al., 2002): *“para poder enviar adecuadamente un mensaje desde un compartimento celular a otro, el mensajero debe llegar al punto de recepción del mismo de forma inalterada o a través de una serie de pasos reproducibles y bien definidos, lo cual es naturalmente trivial con respecto a mensajeros moleculares estables como las hormonas. Con respecto a los radicales, que por su naturaleza son especies reactivas, el postulado es menos trivial”*.

Partiendo de aquí, podemos preguntarnos cuántos subtipos de NOX se expresan en el CC y más específicamente en las CQ, donde a través de los productos enzimáticos, contribuyen al control de la detección de O₂ y la cascada de transducción. Kummer y Acker (1995) localizaron inicialmente p22^{phox}, gp91^{phox}, p47^{phox}, y p67^{phox}, es decir NOX2, en CQ de ratas, aunque algunos años después, el laboratorio de Kummer (Dvorakova et al., 2000) utilizando un anticuerpo específico monoclonal contra gp91^{phox} y marcadores adicionales, concluyó que la NOX2 se localizaba en macrófagos localizados en el CC de la rata. Este resultado a su vez, daría una justificación completa a los estudios funcionales de He y cols. (2002) mostrando que el ratón KO de gp91^{phox} preservaba corrientes normales de K⁺ y la magnitud de la inhibición hipóxica, con corrientes de Ca²⁺ normales y actividad en el NSC normal, así como una ventilación normal frente a la hipoxia aguda. Estos hechos en conjunto certificarían que NOX2 no está implicada en la detección-transducción de O₂ en ratón y probablemente ocurra lo mismo en rata.

Sin embargo, el mismo año, el laboratorio de Fidone (Sanders et al., 2002) mostró que un ratón KO p47^{phox} exhibía descargas exageradas en el NSC así como potenciación de las respuestas ventilatorias a los test de hipoxia aguda, con niveles normales de la expresión del mensajero de EPO tras 72 horas de hipoxia. En un estudio adicional, el laboratorio de Fidone (He et al., 2005) mostró que los niveles basales de la producción normóxica de ROS eran comparables en las células del ratón KO y del control, que la hipoxia aumentaba la producción de O₂^{•-} (en base a la oxidación de dihidroetidina; DHE) en células controles, pero no en los KO, que la producción hipóxica de ROS era sensible a los inhibidores de la NADPH oxidasa y que el porcentaje de la inhibición de las corrientes de K⁺ por la hipoxia y las

corrientes de Ca^{2+} desencadenadas por la hipoxia eran mayores en las células KO que en las controles. Estos hechos, junto con datos adicionales de Northern blot (He et al., 2010) y el uso de bloqueantes de canales de Ca^{2+} tipo L, permitieron concluir: a) que la NOX que se expresa en las CQ es NOX4 (González et al., 2007) y que la NOX no es el sensor de O_2 ; b) que las ROS derivadas de NOX actúan como moduladores negativos de la cascada de transducción hipóxica aguda; c) que la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio tipo L es la responsable de la activación de NOX durante la hipoxia y d) que la mitocondria no aumenta su velocidad de producción de ROS en hipoxia ya que la velocidad de oxidación de DHE no estaba alterada por la hipoxia en las células KO. Obviamente estos hechos necesitan ser reinterpretados a la luz de nuevos descubrimientos. Hasta donde sabemos en la actualidad, p47^{phox} no forma parte de NOX4 y es obvio que las CQ pueden expresar al menos más de una isoforma de NOX que requiera esta subunidad (p.ej., NOX1, NOX2 o NOX3) para explicar la pérdida de la capacidad quimiorreceptora de las células para producir ROS en los animales KO de p47^{phox} . Puesto que en las células acinares pancreáticas el Ca^{2+} puede mediar la activación de NOX1 y la producción de ROS (Yu et al., 2007), sugerimos que ésta es la isoforma que contiene p47^{phox} en las CQ y que se activa como resultado de la entrada de Ca^{2+} promovida por la hipoxia aguda (Peng et al., 2009). Además estos últimos autores sugieren que las ROS generadas por la NADPH oxidasa juegan un papel clave en la sensibilización que ocurre al exponer los animales a hipoxia sostenida, simulando la hipoxia de alturas.

7.1.1.4 Sensores de O_2 conformacionales

Este modelo de sensor ha sido propuesto por nuestro laboratorio y, según veremos en los párrafos siguientes, consideramos que está avalado por hechos experimentales sólidos, pero desafortunadamente incompletos. Aquí nos estamos refiriendo a moléculas que se ligarían al O_2 en concentraciones proporcionales (aunque la relación precisa sea compleja p.ej. de tipo sigmoideo) a la PO_2 de su entorno, experimentando cambios conformacionales que serían alostéricamente transmitidos a los primeros efectores de la cascada de transducción, como por

ejemplo los canales de K⁺ sensibles a O₂. En esta categoría, han sido propuestos como sensores una hemoproteína desconocida, canales iónicos y NOX4.

Dejando de lado los canales iónicos como posibles sensores de O₂, hay dos conceptos unidos a nuestra propuesta de modelo conformacional para el sensor de O₂ en respuesta a la hipoxia aguda en las CQ. En primer lugar, que esta molécula debe ser una hemoproteína y segundo, que debe estar localizada en la membrana plasmática o fuertemente unida a algún componente de la misma. Vamos a tratar de justificar nuestro punto de vista en base a la literatura existente.

¿Por qué una hemoproteína? Hay que señalar que esta noción no es nueva, ya que la literatura concerniente al CC ya contenía la idea de que el sensor de O₂ podía ser una hemoproteína tipo Hb con una P₅₀ cercana a 40 mmHg y un efecto Bohr especial (ver Fidone y González, 1986). En segundo lugar, la idea renació cuando López-López y González (1992) mostraron que en CQ de conejo en configuración *whole-cell*, el CO prevenía o revertía la inhibición de las corrientes de K⁺ producidas por la hipoxia. Se conoce que todas las hemoproteínas, tal y como se ejemplifica con la mioglobina y particularmente con la Hb, cuando unen y liberan O₂, sufren cambios conformacionales en su estructura terciaria y cuaternaria. Por tanto, un cambio conformacional en una hemoproteína puede ser alostéricamente transmitido a los canales iónicos para causar modificaciones importantes así como para provocar su apertura si las relaciones físicas entre ambos elementos son las apropiadas. Además tal y como exponen Streit y cols. (2010), el grupo hemo posee una naturaleza catalítica muy versátil y es capaz de construir bloques con proteínas (hemoproteínas) que poseen un amplio rango de potenciales redox y que hacen posible transferencias electrónicas con una especificidad prácticamente imposible de reproducir sintéticamente. Sin embargo, debe añadirse, que los parámetros cinéticos específicos de las funciones de las hemoproteínas son dependientes de la fracción proteica, como se ejemplifica con las diferencias en las afinidades de unión entre el O₂ y el CO en la Hb (la afinidad del CO es ≈ 300 veces > que la afinidad del O₂) frente a la citocromo oxidasa (la afinidad del CO es 5-10 veces > que la afinidad del O₂). Otro ejemplo que queremos brindar es el caso de la NOX2; en su revisión clásica de la NADPH oxidasa (NOX2), Cross y Jones (1991) dan una constante de Michaelis Menten (K_m) para el O₂ que oscila entre 5 y 30 μM, pero de acuerdo con

Iizuka y cols. (1985) y Parkos y cols. (1988) ésta no une CO o lo hace con bajísima afinidad (ver también Basuroy et al., 2009). Tras la descripción de los canales de K⁺ sensibles a la hipoxia (López-Barneo et al., 1988) se demostró que los registros de parches de membrana de CQ aisladas de conejo en configuración *inside out* contenían una baja conductancia unitaria de los canales de K⁺ que era inhibida reversiblemente por la baja PO₂ (Ganformina y López-Barneo, 1991). Esto implicaba que la membrana contenía todos los elementos necesarios para detectar el O₂ y para acoplar el sensor de O₂ a los primeros efectores de la cascada de transducción, los canales de K⁺. Años más tarde, nuestro laboratorio mostró que en parches aislados en configuración *inside out* obtenidos de células HEK, cotransfectadas con subunidades reguladoras Kv4.2 + Kvβ1.2, que los canales eran sensibles al O₂, siendo reversiblemente inhibidos por la hipoxia y también siendo sensibles al CO de tal manera que el CO prevenía la inhibición hipóxica (Pérez-García et al., 1999). En un amplio estudio trabajando con parches de membrana aislados de CQ de rata en configuración *inside out*, se demostró que las bajas PO₂ disminuían la Po de los canales maxi-K (Riesco-Fagundo et al., 2001). La inhibición de la actividad del canal era dependiente de Ca²⁺ y del Em, siendo máxima a bajas concentraciones de Ca²⁺ y a Em negativos; la extrapolación de los datos experimentales, indicaría que los voltajes cerca del umbral para la mayoría de las corrientes dependientes de voltaje en las CQ (alrededor de -40mV) hacían que la inhibición hipóxica del maxi-K fuera casi completa (Riesco-Fagundo et al., 2001). Otro descubrimiento de gran interés en el estudio de Riesco-Fagundo y cols. (2001) fue que el CO podía revertir completamente los efectos de la hipoxia en parches aislados afectando a la disminución de la Po. Aunque no hay análisis cinéticos detallados de los efectos del CO, parece que la afinidad de la molécula sensora de O₂ debe tener afinidades comparables para el O₂ y el CO. Como se ha mencionado arriba, en una preparación de CQ de conejo en configuración de *whole-cell* donde la principal (o única) corriente de K⁺ sensible a O₂ es conducida por un canal que expresa una corriente transitoria, con toda probabilidad Kv4.3 (Kaab et al., 2005; Sánchez et al., 2002), también se encontró que el CO era capaz de sustituir el O₂ a nivel del sensor de O₂ con afinidad comparable (López-López y González, 1992). En este contexto, los datos experimentales sobre VPH, indican que utilizando una preparación de

circulación pulmonar de rata *in situ* perfundida artificialmente, el CO prevenía igualmente o revertía la VPH (Tamayo et al., 1997). La sensibilidad delimitada a la membrana no está restringida al canal Kv sensible a O₂ expresado en CQ de conejo (probablemente Kv4.3) o maxi-K en las de rata; también hay evidencia de que las células HEK pueden expresar Kv4.2 (Pérez García et al., 1999) o maxi-K (Williams et al., 2004) sensibles a O₂. Además Osipenko y cols. (2000) mostraron que la hipoxia inhibía a los canales Kv3.1b (expresando sensibilidad nativa al O₂ en CMLAP) expresados en células L929, tanto en la preparación en configuración *whole-cell*, como en registros de canal único en configuración *cell attached* o en parches aislados en configuración *inside-out*, sin afectar la conductancia unitaria, concluyendo que la detección de O₂ era un mecanismo asociado y delimitado a la membrana. Es esta diversidad molecular de los canales sensibles a O₂ y de los canales sensibles a CO, lo que hace improbable que los canales sean por sí mismos los sensores, ya que actualmente no se conocen candidatos con motivos comunes que den prueba de ello (González et al., 2009). La noción de una única hemoproteína sensora capaz de interactuar alostéricamente con varios canales iónicos de igual manera que las quinasas interactúan con diversos sustratos, es conceptualmente más concebible. De hecho, el laboratorio de Park tiene 2 publicaciones (Lee et al., 2006; Park et al., 2009; **Figura 15**) que apoyan este concepto de la hemoproteína, e indican que “la hasta ahora proteína desconocida en la membrana de las CQ” podría ser de hecho NOX4. En su primer estudio, estos autores mostraban un canal recombinante TASK-1 expresado en células HEK que no puede detectar el O₂. Sin embargo, si cotransfectan o expresan endógenamente NOX4, que colocaliza en la membrana plasmática de las células HEK con TASK-1, esto confiere sensibilidad al O₂ a los canales TASK. Esta sensibilidad hipóxica es sensible a difeniliodonio (DPI) y NADP⁺. Además la sensibilidad a la hipoxia es abolida por el silenciamiento de NOX4. Los autores concluyen que una nueva función para NOX4 sería proporcionar a TASK-1 la propiedad de ser regulado por el O₂. En el segundo estudio, utilizando la misma preparación, probaron el CO y encontraron que éste bloquea el efecto inhibitorio de la hipoxia sobre las corrientes de TASK-1, implicando que el CO interactúa con NOX4 (Basuroy et al., 2009). Además el H₂O₂ no lo alteraba y el ácido ascórbico no revertía los efectos

inhibitorios de la hipoxia sobre TASK-1, lo que excluía una acción directa de las ROS.

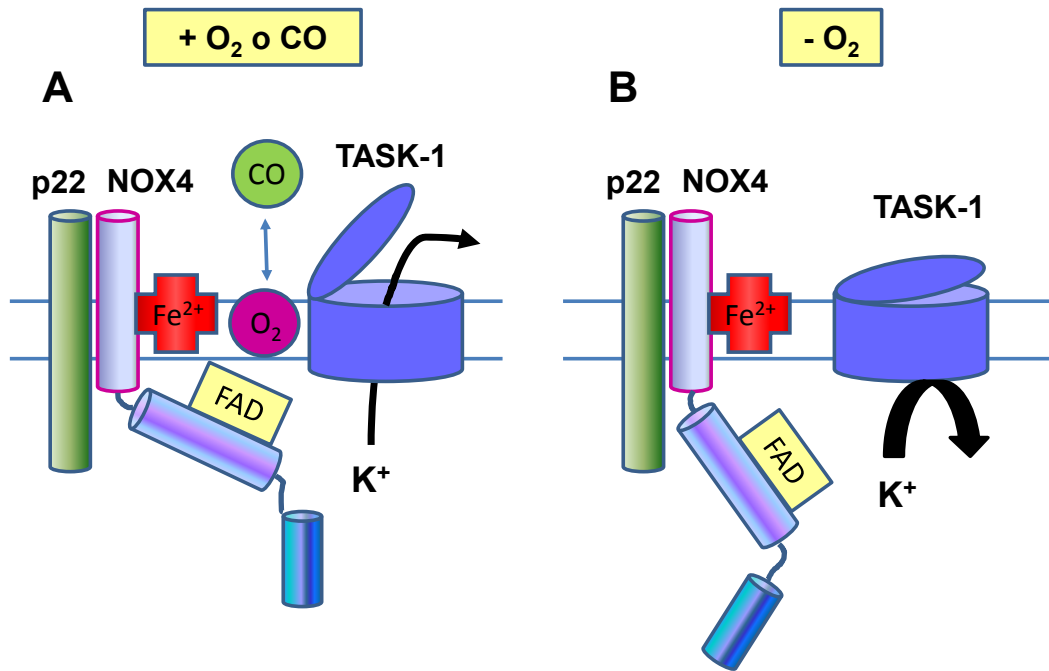


Figura 15. Modelo esquemático de la regulación dependiente de O₂ de TASK-1 por NOX4. En normoxia, el grupo hemo de NOX4 se une con el O₂. **A:** el grupo hemo oxigenado en concierto con los dominios de unión-FAD forma una conformación específica de NOX4 facilitando la actividad de TASK-1. El CO es intercambiable con el O₂ ligado al grupo hemo, manteniendo la conformación facilitadora. **B:** Bajo condiciones hipóxicas, el grupo hemo desoxigenado no permite la señal positiva desde NOX4 hacia TASK-1, disminuyendo la corriente de K⁺. (Tomado de Park et al., 2009).

La construcción específica de mutantes de NOX4 confirmaba estos resultados. Su conclusión final es que el cambio conformacional de NOX4 en su punto de unión o liberación de O₂ (o CO), con la participación como intermediario de p22^{phox}, es transmitido a los TASK-1 modificando su P_o: la desaturación de O₂ disminuye ésta. Dejando de lado los problemas inherentes a los sistemas heterólogos, los hallazgos de Park reafirman los datos de que la sensibilidad al O₂ de las CQ es un proceso delimitado a la membrana que requiere la participación de una hemoproteína que podría ser NOX4, aunque la localización perinuclear de NOX4 propuesta por Peng y cols. (2009) no satisface la noción de que tanto el receptor como la señal deben encontrarse en el lugar correcto para producir los efectos biológicos.

En estos últimos años, en el laboratorio en el que he realizado este trabajo de Tesis Doctoral, se ha intentado resolver lo que constituye el mayor *handicap* para el

modelo conformacional, el desconocimiento de la identidad molecular de la presunta hemoproteína. Buscando hemoproteínas con afinidad para O₂ adecuada con la P₅₀ de funcionamiento del CC, se sospechó que quizás la neuroglobina fuera la hemoproteína desconocida ya que su afinidad por O₂ era ≈ 10 mmHg (Fago et al., 2004 a, b). Se intentó eliminar su expresión con RNAi en una preparación de CC intactos en cultivo y desafortunadamente los experimentos no fueron exitosos tras múltiples intentos usando RNAi dirigidos a distintos locus del gen.

7.2 Acidosis- Hipercapnia

La acidosis y la hipercapnia son otros dos estímulos naturales para el CC que en ocasiones se dan de forma combinada originando la llamada acidosis respiratoria (acidosis hipercápica). La anhidrasa carbónica es la enzima que acelera la hidratación y deshidratación del CO₂, acelerando el cambio en la [H⁺] en respuesta a alteraciones de la PCO₂. La inhibición de esta enzima, que se localiza intracelularmente en las CQ (Rigual et al., 1985), elimina los cambios transitorios en el incremento de la frecuencia de descargas producido por la estimulación hipercápica tanto *in vitro* (Rigual et al., 1991; Buckler y Vaughan-Jones, 1993) como *in vivo* (Nye et al., 1981) lo cual implicaría que la señal que se detecta en el CC es la concentración de protones intracelular. La perfusión del CC con soluciones a un pH fisiológico, pero conteniendo ácidos débiles o con una PCO₂ elevada produjo un aumento de descargas nerviosas y secreción de CA *in vitro* del mismo modo que la acidosis metabólica e hipercápica (Rigual et al., 1991). El aumento de la PCO₂ en el medio de perfusión de las CQ provoca un aumento brusco en la [H⁺]_i, que se estabiliza en un nivel superior al basal, correlacionándose con lo que ocurre tanto en la secreción de CA (Rigual et al., 1991) como a nivel de las descargas en el NSC (Buckler y Vaughan-Jones, 1993; McCloskey, 1968). Por otro lado, la liberación evocada por estímulos ácidos es dependiente del Ca²⁺_e en ≈ 80% (Obeso et al., 1992; Rigual et al., 1991). Estos hallazgos, unidos a la medida del pH_i y [Ca²⁺]_i en estas situaciones (Buckler y Vaughan-Jones, 1993), nos permiten concluir que la señal que detecta el CC es la [H⁺]_i en las CQ y no el aumento de la PCO₂.

En estudios electrofisiológicos en CQ de rata se encontró que los estímulos ácidos, al igual que la hipoxia, son capaces de despolarizar las células y generar PA

(Buckler y Vaughan-Jones, 1993; 1994 a). La amplitud de despolarización y las ráfagas de PA son similares a las observadas con hipoxia (Buckler y Vaughan-Jones, 1994 a). Por otro lado se ha encontrado que canales de K^+ sensibles a hipoxia también son sensibles a la acidosis. Así, el maxi-K muestra sensibilidad al pH_i (Peers y Green, 1991) y el TASK-1 al pH_e (Buckler et al., 2000).

Aunque en estudios previos en CC de conejo intacto (Rocher et al., 1991) se había propuesto un modelo de transducción en el que las CQCC no se despolarizaban, datos más recientes, también de nuestro laboratorio (Rocher et al., 2005), han demostrado con registros directos que las células se despolarizan. De esta manera la cascada de transducción ácida sería como se muestra en la **Figura 16**.

Como conclusión se puede decir que la transducción del estímulo ácido resulta cuando menos, tan compleja como la del estímulo hipóxico. Las CQ son capaces de responder a ambos estímulos de modo independiente, aunque parece que su efecto sobre los niveles de Ca^{2+} en las CQ es multiplicativo, lo que implica una sinergia entre ambos estímulos (Dasso et al., 2000).

En estudios recientes, el laboratorio de Abboud (Lu et al., 2013; Tan et al., 2007) ha encontrado que además de la inhibición de canales de K^+ los estímulos ácidos activan una corriente de entrada que con la ayuda de bloqueantes, llegan a identificar como una corriente mediada por canales aniónicos sensibles a ácido (ASIC; *acid sensitive anion channel*), que contribuiría a la despolarización.

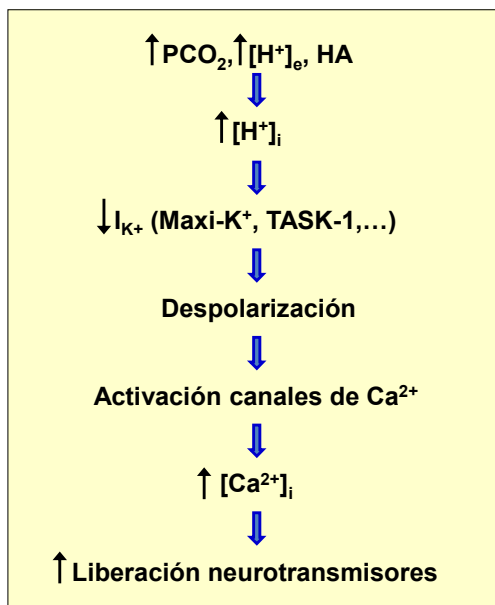


Figura 16. Modelo de transducción del estímulo ácido-hipercápnico.

Modelo propuesto por el grupo de Buckler y por nuestro laboratorio, donde la entrada del Ca^{2+} se produce por despolarización tras la inhibición de canales de K^+ (Buckler et al., 2000).

8. SEGUNDOS MENSAJEROS Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS QUIMIORRECEPTORAS

El Ca^{2+}_i es considerado el segundo mensajero universal, que conecta la generalidad de las señales extracelulares con efectores intracelulares y no voy a considerar de forma específica su papel porque en realidad lo he hecho en otros apartados. En la sección anterior hemos detallado cómo el seguimiento de los movimientos del Ca^{2+} a través de la membrana de las CQ llevó a la búsqueda de mecanismos que abrieran los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, que nuestro laboratorio había demostrado que la hipoxia activaba. En una revisión reciente (Rocher et al., 2011) se describe de forma precisa la historia del Ca^{2+} como segundo mensajero en las CQ y su papel frente a los distintos estímulos.

En esta sección vamos a tratar también al óxido nítrico (NO), al monóxido de carbono (CO) y al sulfuro de hidrógeno (H_2S) como segundos mensajeros y su significado en la quimiorrecepción, aunque en sentido estricto es difícil clasificar a estas tres moléculas como segundos mensajeros. Otros autores prefieren llamarlas gasotransmisores o transmisores gaseosos (Prabhakar, 2012; Schultz et al., 2012).

8.1 Papel de los gasotransmisores en la detección hipóxica por el CC

A finales de 1960, Lloyd y cols. publicaron que la inhalación breve de CO eliminaba la hiperventilación hipóxica, un reflejo característico que se inicia a nivel del CC en la especie humana. Como el CO tiene una mayor afinidad por la Hb que el O_2 y además inhibe la respuesta ventilatoria hipóxica, se propuso que la activación del CC por la hipoxia implicaba un cambio conformacional oxi-deoxi de una hemoproteína (ver apartado de sensores conformacionales). Muchas de las enzimas asociadas con la generación celular de gasotransmisores, especialmente con el NO y el CO, son proteínas que contienen grupos hemo y su actividad enzimática requiere O_2 molecular. Además, al igual que el O_2 , el NO y el CO se unen al grupo hemo (Abu-Soud et al., 1996) y la mayoría de sus acciones biológicas se deben a la activación de hemoproteínas (Snyder, 1992). El H_2S , otro gasotransmisor emergente (Buckler, 2012; Olson, 2013) promueve un medio celular reducido. Por lo tanto el NO y el CO se parecen al O_2 en algunos aspectos, mientras

que el H₂S se asemejaría a la hipoxia. Estos hechos han llevado a estudiar su papel en el CC, y los datos obtenidos sugieren que el NO y el CO son inhibitorios y que el H₂S es excitatorio.

8.1.1 Gasotransmisores inhibitorios

El NO se produce en la reacción de conversión de L-arginina a L-citrulina catalizada por una familia de enzimas, óxido nítrico sintasas (NOS), que requieren O₂ para su actividad. Se han identificado 3 isoformas de NOS: neuronal (NOS_n), endotelial (NOS_e) e inducible (NOS_i) (Snyder, 1992). Las isoformas neuronales y endoteliales se expresan de forma constitutiva y requieren Ca²⁺ para su actividad, mientras que la isoforma inducible se expresa en respuesta a una variedad de estímulos, incluyendo la hipoxia, y no requiere Ca²⁺. Las 3 isoformas contienen un grupo hemo que liga el O₂, siendo la NOS_n la más sensible al O₂ dada su alta Km, sugiriendo que disminuciones moderadas en la [O₂] causarían una pérdida significativa de su actividad; de hecho existe una correlación entre la [O₂] y la actividad de NOS_n en todo el rango fisiológico (Abu-Soud et al., 1996).

El CO se genera durante la degradación del grupo hemo por las hemo oxigenasas (HO) requiriendo O₂ molecular (Maines, 1997). Se han identificado 2 isoformas de HO: HO-2, constitutiva y HO-1, inducible (Maines, 1997). El bloqueo de HO por zinc-protoporfirina-9 estimula la actividad del CC, mientras que las altas concentraciones de CO la inhiben (Prabhakar et al., 1995). Aunque la respuesta de las CQCC no está alterada en *knockouts* de HO-2 (Ortega-Saenz et al., 2006), éste ratón tiene una mayor actividad basal del CC así como una mayor respuesta a la hipoxia (Prabhakar., 2012), sugiriendo que el CO generado por la HO-2 es un gasotransmisor inhibitorio.

8.1.2 Excitación sensorial por la hipoxia: un papel para el H₂S

No se conoce bien la biología del H₂S dentro de la función del CC mamífero, y como consecuencia, existe controversia en torno a ella. Para algunos autores, el H₂S endógeno tiene una concentración demasiado pequeña para ser el componente principal en la génesis de la respuesta hipóxica (Haouzi et al., 2011;

Buckler, 2012) y los efectos observados tras la aplicación de H₂S exógeno (en forma de NaHS) serían debidos a la inhibición “farmacológica” de la citocromo oxidasa. Sin embargo, otros autores, consideran que la concentración endógena es la correcta como para ser responsable de un 70-80% de las respuestas hipóxicas (Peng et al., 2010) o podría ser adecuada para modular la detección de oxígeno en el CC (Olson, 2013). Aparte de la concentración, existen al menos dos problemas adicionales con la biología del H₂S en el CC. En primer lugar, ¿cuál es la enzima responsable para su génesis? Para el laboratorio de Prabhakar es la cistationina y liasa (CSE) mientras que para Li et al. (2010) es la cistationina β sintasa (CBS) y para Olson, el supuesto aumento de H₂S inducido por la hipoxia se debería principalmente a un descenso tanto en su degradación enzimática como no enzimática, ambas dependientes de O₂ (Vitvitsky et al., 2012). El aceptar uno u otro enzima como generador de H₂S en el CC no es trivial. Mientras que es concebible que la CBS esté directamente regulada por O₂, CO y NO ya que posee un grupo hemo no hay, según nuestro conocimiento, dominios en la CSE que sean susceptibles de ser regulados por estos gases (Morikawa et al., 2012). El segundo problema es que la principal diana aparente del H₂S sería el maxi-K que se inhibiría por el H₂S; sin embargo, varios laboratorios han mostrado que la inhibición completa del maxi-K no afecta a la detección de O₂ en el CC; debe añadirse que Buckler (2012) ha mostrado que el H₂S también inhibe las corrientes de fuga (“leaky”) de K⁺ en las CQCC, aunque muy recientemente el mismo laboratorio (Turner y Buckler, 2013) ha mostrado que TASK-1/3 no son críticos para la detección de O₂. Pese a todas estas consideraciones, parece que el H₂S a niveles endógenos de ≈30 nM (hígado) y de 18 nM (cerebro), produce efectos fisiológicos. Su concentración está realmente muy por debajo de la constante de inhibición (K_i) para la citocromo oxidasa que es comparable con la del cianuro (200 nM; Cooper y Brown, 2008) y es 5-10 mayor que la [NO] endógena (1-10 nM). En este sentido debe señalarse que los donadores de NO, así como los de H₂S, son utilizados en el rango de micromolar.

9. PAPEL DEL AMP_c EN LA TRANSDUCCIÓN SENSORIAL

La concepción moderna de la membrana celular como transductora de señales extracelulares nace de los experimentos de Sutherland durante sus estudios de la regulación hormonal del metabolismo a finales de los cincuenta, con el descubrimiento del 3-5'adenosina monofosfato cíclico (AMP_c) (Sutherland y Rall, 1958). El AMP_c es un segundo mensajero universal prototípico, que modula procesos fisiológicos en todas las células (Hanoune y Defer, 2001) siendo capaz de modular funciones completamente opuestas dentro de una misma célula (Buxton y Brunton, 1983). El AMP_c se genera por las enzimas adenilato ciclasas (AC) que catalizan la ciclación del ATP para generar AMP_c y pirofosfato inorgánico (PPi). En los mamíferos, el AMP_c se genera a partir de 2 tipos de AC de clase III ampliamente expresadas, una familia transmembrana (AC_{tm}, AC1 a AC9) codificada por 9 genes distintos (I-IX) y una adenilato soluble más recientemente descrita (ACs). Las AC_{tm} están reguladas directamente por proteínas G heterotriméricas y generan AMP_c en respuesta a hormonas y NT que actúan a través de receptores acoplados a las proteínas G (GPCRs) (Taussig y Gilman, 1995).

La subunidad G_{sα} de las proteínas G estimula casi todas las isoformas de las AC_{tm}, mientras que G_{iα} inhibe selectivamente los tipos I, V y VI; las distintas subunidades βγ también ejercen su propia regulación sobre las diversas isoformas de AC (Sunahara y Taussig, 2002). La calmodulina estimula directamente la AC_{tm} tipo I y VIII, (Tang et al., 1991) mientras que la proteína quinasa A (PKA) regula los tipos V y VI (Chen et al., 1997; Iwami et al., 1995) y la PKC regula los tipos II, V y VI (Jacobowitz y Iyengar, 1994).

Las AC_{tm} también pueden ser reguladas mediante modificaciones post-traducción (Cali et al., 1996) o bien mediante proteínas reguladoras de la señalización por proteínas G (RGS) que regulan directamente la AC III, V y VI (Sinnarajah et al., 2001). Finalmente, las AC_{tm} pueden ser reguladas positiva y negativamente por Ca²⁺ dependiendo de la concentración de este ión (Cooper, 2003). Las propiedades individuales de cada isoforma se han ligado a distintos tipos de respuestas fisiológicas como el aprendizaje y la memoria, la función cardíaca o el olfato. La ACs, clonada en 1999 (AC 10; Buck et al., 1999), está

regulada por bicarbonato y por Ca^{2+} (Jaiswal y Conti, 2003) y es independiente de proteínas G heterotriméricas. Los dominios catalíticos de la ACs están relacionados con las AC sensibles a bicarbonato de las cianobacterias (Chen et al., 2000), sugiriendo la conservación de la función de estas ciclasas como sensores de bicarbonato a lo largo de la evolución.

La ACs no es estrictamente una proteína soluble ya que está presente en localizaciones subcelulares en una gran variedad de células con una gran diversidad de isoformas expresadas a partir de un único gen en el genoma mamífero (Geng et al., 2005; Jaiswal y Conti, 2001). Entre los procesos regulados por la ACs están la activación del espermatozoide, la regulación del pH en los epidídimos y la activación de granulocitos por el factor de necrosis tumoral (TNF α). Su especial regulación por bicarbonato sugiere que también contribuye a otros procesos sensibles a CO_2 o como sensor metabólico celular.

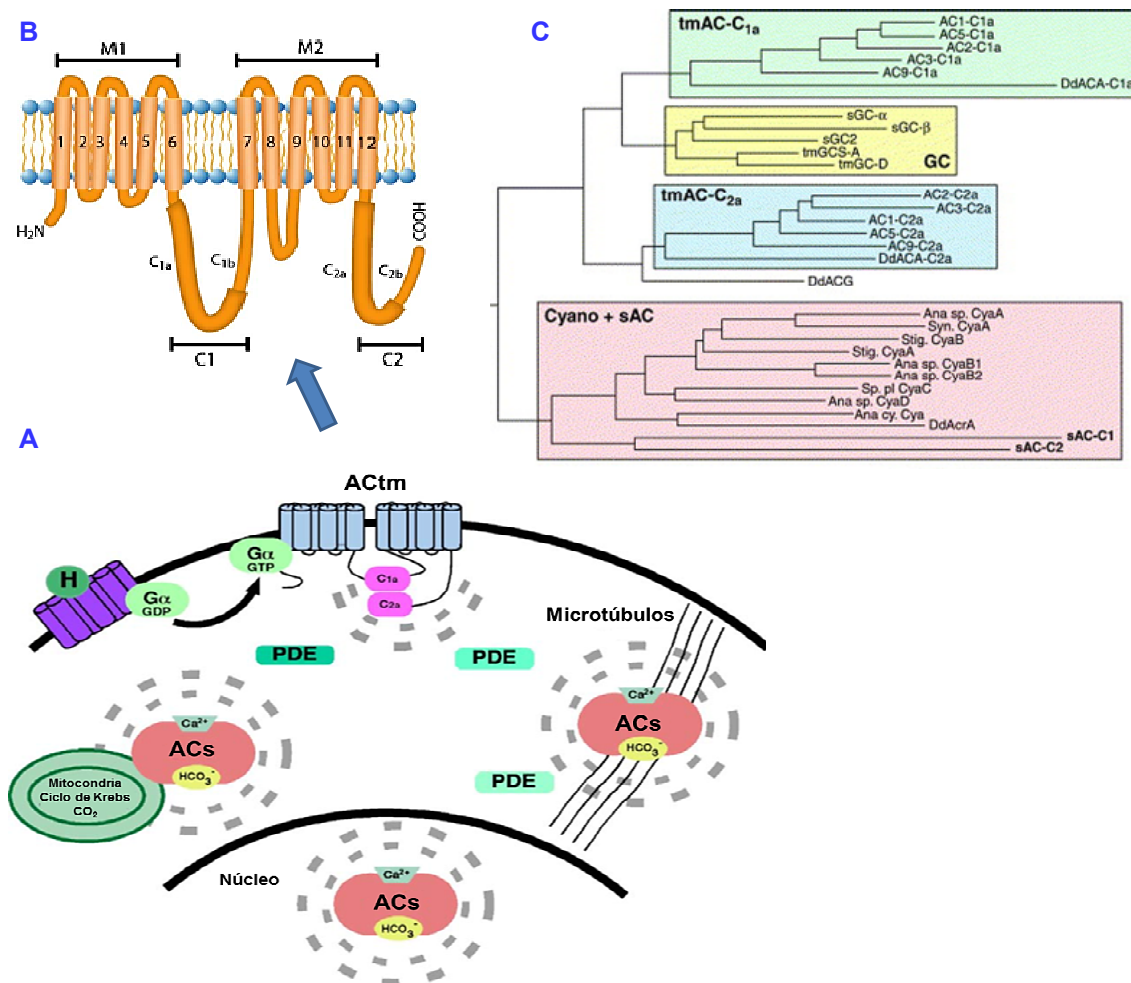


Figura 17. Esquema de la Adenilato Ciclasa en mamíferos. A. Clases y localización en microdominios. B, Estructura y C. Clasificación filogenética.

La AC_{tm} tiene 12 dominios transmembrana (TM), agrupados de 6 en 6, 2 regiones homólogas de unión a ATP y grandes dominios carboxilo y amino terminales (**Fig. 17B**) (Krupinski et al., 1989). El núcleo catalítico, los 2 dominios de unión a ATP con gran homología (C1a y C2a), han de dimerizar para que la AC tenga plena actividad. Las AC no sólo existen como monómeros sino formando parte de estados de mayor orden (dímeros o tetrámeros). Se ha sugerido recientemente que las AC reguladas por Ca²⁺ estarían implicadas en la formación de complejos heteromultiméricos que proporcionarían una íntima asociación con los elementos responsables de la entrada de Ca²⁺ (Willoughby y Cooper, 2006).

Aunque clásicamente se ha considerado como único efector del AMPc a la PKA, un tetrámero formado por 2 subunidades reguladoras y 2 subunidades catalíticas, en la actualidad se sabe que hay al menos 4 tipos de proteínas efectoras de AMPc: la PKA, los canales iónicos regulados por nucleótidos cíclicos, las fosfodiesterasas (PDE) y las proteínas de intercambio de guanosín trifosfato (GTP) activadas por AMPc (Epacs; *Exchange proteins directly activated by cAMP*; Seino y Shibasaki, 2005). La PKA puede fosforilar residuos de serina, treonina o tirosina de otras enzimas, activándolas, o puede modular corrientes iónicas a través de fosforilaciones de canales, representando como hemos dicho la vía clásica efectora del AMPc.

La coexistencia de ACs y AC_{tm}, junto con una amplia familia de PDE (11 familias; Soderling y Beavo, 2000) encargadas de degradar el AMPc, requiere una revisión del modelo original de señalización del AMPc basado en la difusión del segundo mensajero desde la membrana plasmática a lo largo del citoplasma para desencadenar respuestas dependientes del mismo en los orgánulos intracelulares. Los métodos modernos de medida del AMPc *in situ* (sensores basados en transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET) o en conductancia), han revelado que la difusión del AMPc está restringida, sugiriendo la existencia de microdominios donde el AMPc se forma, actúa y se degrada independientemente, bien en la membrana plasmática o intracelularmente (Bundey e Insel, 2004). Esta restricción espacial de las ciclasas y su modulación independiente en diferentes microdominios puede lograrse mediante una gran variedad de mecanismos reguladores de las ACs y AC_{tm}, así como por la participación de una familia de

proteínas de anclaje a PKA (AKAPs) que dirigen a la PKA (y a PDE) a varias localizaciones subcelulares formando complejos con ellos, confirmando la existencia de microdominios de AMPc, tal y como habían postulado Buxton y Brunton en cardiomiocitos (1983).

Existen compuestos activadores de las AC, como la forskolina (FSK), un diterpeno que activa todas las ACtm mamíferas (Seamon y Daly, 1986) mediante la semioocupación del sitio activo sin producir ningún efecto sobre las ACs (Buck et al., 1999; Forte et al., 1983). Existen también inhibidores del sitio P (análogos de adenosina) que inhiben de una forma potente la ACtm (Dessauer et al., 1999) tales como el compuesto 1R,4R-3-(6-aminopurin-9-il)-ciclopentano ácido hidroxiamida carboxílico (PMC-6), capaz de discriminar entre las isoformas de ACtm (Iwatsubo et al., 2004) así como una clase de análogos de nucleótidos sintéticos inhibidores competitivos de las AC, (Gille y Seifert, 2003) que al igual que los ligandos del sitio P son más potentes con las ACtm que con las ACs, pero muestran muy poca selectividad entre las isoformas de las ACtm (Gille et al., 2004). El SQ-22536 inhibe de forma selectiva a las ACtm (Haslam et al., 1978), mientras que el KH7 inhibe específicamente a la ACs (Hess et al., 2005) (Figura 18)

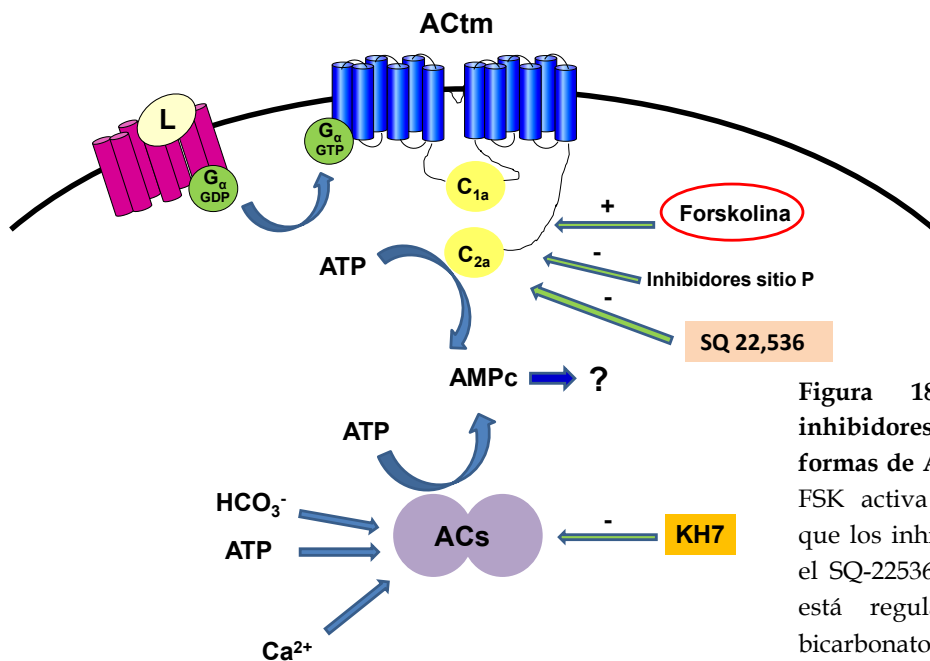


Figura 18. Activadores e inhibidores de las distintas formas de AC en mamíferos. La FSK activa la ACtm, mientras que los inhibidores del sitio P y el SQ-22536 la inhiben. La ACs está regulada por calcio y bicarbonato e inhibida por KH7.

La identificación de las proteínas Epac o factores de intercambio de nucleótidos de guanina (cAMP-GEF) como efectores del AMPc ha cambiado profundamente el dogma PKA/AMPc. Actualmente se conocen muchos procesos

celulares regulados por dichas proteínas, en particular la exocitosis de NT y hormonas, procesos dependientes de AMPc e independientes de PKA. Existen dos isómeros de Epac, Epac 1 y Epac 2, que están codificados por 2 tipos distintos de genes en mamíferos (RAPGEF3 y RAPGEF4). Mientras que Epac 1 se expresa de forma ubicua en todos los tejidos, Epac 2 se detecta de forma más notable en el cerebro, en la glándula pituitaria, glándula adrenal y el páncreas (Li et al., 2006). Recientemente se ha identificado una variante más corta de la proteína Epac 2 resultante del *splicing* alternativo, conocida como Epac 2B, por lo que la isoforma más larga de Epac 2 ha sido renombrada como Epac 2A (Niimura et al., 2009).

Las proteínas Epac actúan como factores de intercambio específicos de nucleótidos de guanina (GEFs) para los miembros de la familia de la proteína guanosa trifosfatasa (GTPasa) Ras: Rap 1 y Rap 2 (**Figura 19**). Tras la unión del AMPc, Epac activa Rap mediante el intercambio de la forma unida a guanosín difosfato (GDP) por la forma unida a GTP, mientras que las proteínas activadoras de las GTPasas (GAP) lo revierten a su estado inactivo unido a GDP.

Las proteínas Epac están implicadas en múltiples procesos celulares. Uno de los primeros papeles asignados a Epac, y en particular a Epac 2, fue la regulación de la secreción de insulina, sugiriendo que esta proteína podía ser una diana farmacológica relevante para el tratamiento de la diabetes (Kang et al., 2003). La señalización Epac 2/Rap 1 es esencial en la regulación de la dinámica de los gránulos de insulina por AMPc, probablemente mediante el control de la densidad de dichos gránulos cerca de la membrana plasmática. Otras vías importantes están relacionadas con los procesos de hipertrofia de los cardiomiocitos (McConnachie et al., 2006) donde Epac parece estar acoplada a proteínas de anclaje AKAP formando complejos específicos que regulan compartimentalmente la acción del AMPc según las necesidades de la célula. También están implicadas en la facilitación de la exocitosis merced a la interacción directa de Epac-Rab 3 (una proteína G monomérica) y Rim 2 y Piccolo (proteína asociada a gránulos secretores; Ozaki y cols., 2000).

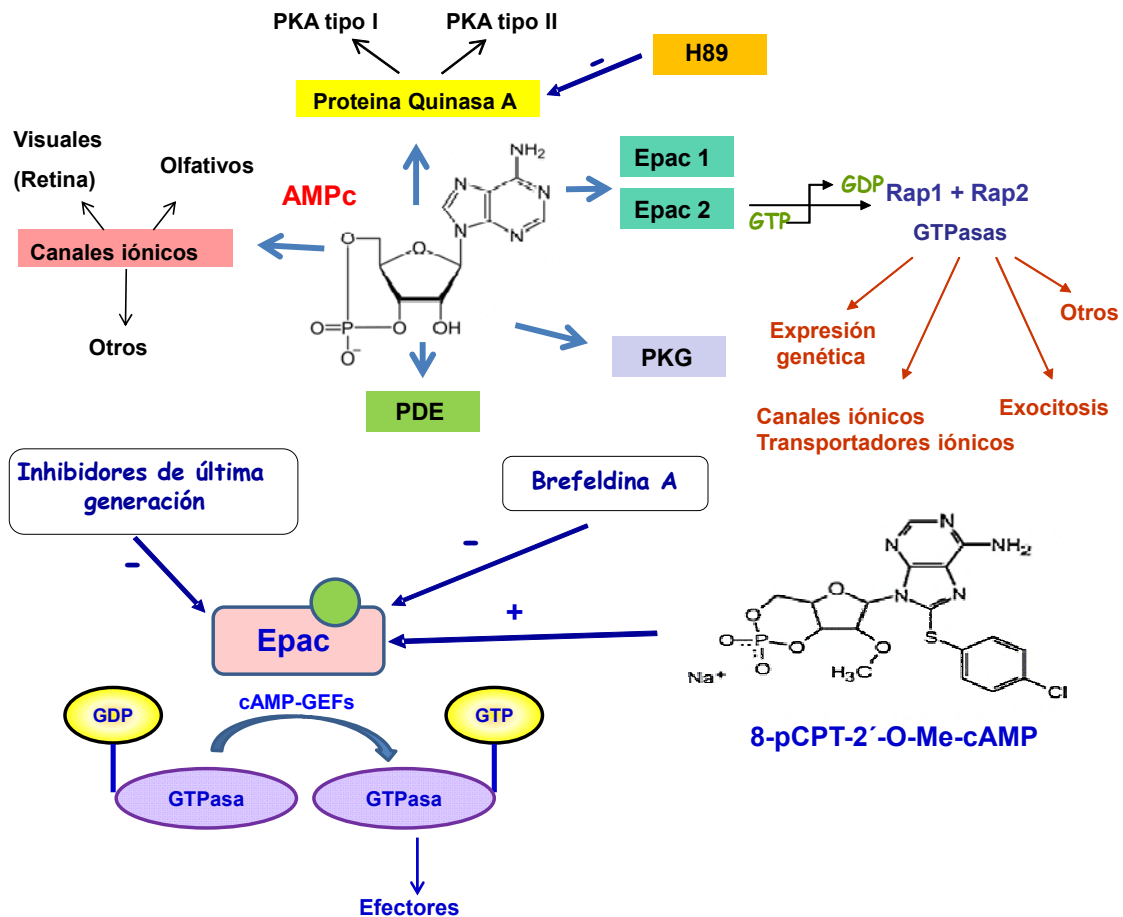


Figura 19. Vías de señalización del AMPc. Se muestran los distintos efectores del AMPc: PKA, canales iónicos, PDE, proteína quinasa G (PKG) y Epac. En la imagen también se muestra el mecanismo de acción de Epac sobre sus efectores inmediatos cascada abajo, Rap 1 y Rap 2, que son miembros de la familia de pequeñas GTPasas, que se activan cuando Epac se une con el AMPc y desencadena un cambio conformacional en las mismas mediante el intercambio de la forma unida a GDP por la forma unida a GTP, desencadenando la respuesta fisiológica. También se muestran los inhibidores específicos tanto de la PKA (H89) como de Epac (Brefeldina A; BFA) así como otros inhibidores específicos de última generación que permiten diferenciar las acciones de ambas.

Rab 3 es un modulador de la maquinaria exocitótica (Sudhof, 2004) y sería el efector de la facilitación de la exocitosis. Para una $[Ca^{2+}]_i$ dada, este mecanismo aumenta la probabilidad de liberación de los gránulos secretorios que están en el *pool* fácilmente liberable y acelera el relleno de este *pool* (Renstrom et al., 1997).

Epac 2 también puede interactuar directamente con el receptor 1 de sulfonil urea (SUR1), la subunidad de los canales de K^+ sensible a ATP (K^+_{ATP}) en células β pancreáticas y células INS-1 de insulinoma de rata. Un agonista selectivo de Epac, el 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, también conocido como ESCA (*Epac-selective cAMP analog*), inhibe las corrientes IK_{ATP} despolarizando la membrana y abriendo canales

de Ca^{2+} dependientes de voltaje, contribuyendo así a la liberación de insulina (Kang et al., 2008). Otro posible mecanismo incluye la modulación por Epac 2 de los canales de Ca^{2+} tipo L (Liu et al., 2006). Por lo tanto, Epac parece regular la secreción de la insulina mediante la interacción con proteínas asociadas a los gránulos secretores y a la regulación de los canales iónicos. A través de Rap 1, Epac puede conducir a la activación de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) y de la quinasa activada por mitógenos (MAPK) además de la modulación de canales iónicos (Yuan et al., 2006).

La PKA y Epac a menudo están asociadas dentro del mismo proceso biológico, con efectos sinérgicos u opuestos. En las células endoteliales ambos efectores de AMPc coordinan la adhesión celular y la permeabilidad (Rampersad et al., 2010). La activación directa de Epac o PKA con análogos de AMPc, puede modular la comunicación intercelular a nivel de las *gap junctions* en cardiomiocitos, mediante la regulación de la conexina-43. Estos efectos parecen estar controlados mediante los complejos de anclaje como el de mAKAP (*muscle A kinase-anchoring protein*) capaz de diseminar simultáneamente las señales de AMPc para Epac, PKA, PDE y la proteína fosfatasa 2A (PP2A) hacia la membrana de los cardiomiocitos (Dodge-Kafka et al., 2005).

9.1 PAPEL DEL AMP_c EN EL CC

En muchos sistemas sensoriales, los nucleótidos cíclicos son los factores de acoplamiento entre los estímulos y la maquinaria iónica que desencadena los cambios en el Em asociados con la transducción del estímulo (Avenet et al., 1988; Fesenko et al., 1985; Nakamura y Gold, 1987). Además, en dichos sistemas los segundos mensajeros modulan directamente la liberación de NT (Greengard, 1978).

En el CC, el sistema AC-AMPc fue el primer sistema de mensajeros intracelulares estudiado con cierto detalle. Varios laboratorios, incluido el nuestro, demostraron que la estimulación con baja PO_2 aumentaba el contenido de AMPc en CC de conejo y gato, incubados en una gran variedad de condiciones diferentes, estando dicho aumento restringido a las CQ (Pérez-García et al., 1990; Wang et al.,

1991), Aunque otros estímulos, incluyendo la alta PCO_2 /bajo pH y varios agentes farmacológicos, también aumentan el contenido de AMPc en el CC de conejo, la hipoxia es el único estímulo que aumenta los niveles de AMPc en ausencia de Ca^{2+}_e (Pérez-García et al., 1990), sugiriendo una activación directa de la AC por la hipoxia, independiente de los NT liberados (ver **Figura 20**).

Por el contrario, los estímulos despolarizantes tales como el alto K^+_e no son capaces de activar la AC directamente, sino sólo a través de la acción secundaria de los NT liberados (Pérez-García et al., 1990). Además, las maniobras que aumentan los niveles de AMPc, como la activación de AC con FSK, la inhibición de PDE con isobutilmetilxantina (IBMX) o la incubación con análogos permeables de AMPc, potencian la liberación de CA y la respuesta del NSC desencadenada por la hipoxia, pero no la inducida por alto K^+ (Pérez-García et al., 1991).

El AMPc parece activar la cascada de transducción hipóxica al menos en 2 etapas diferentes. Por un lado, inhibiendo las corrientes de K^+ sensibles a O_2 , potenciando así el efecto del estímulo hipóxico (López-López et al., 1993) y por otro lado modulando la maquinaria excitotóxica de las CQ (Pérez-García et al., 1990). Sin embargo, los canales de Ca^{2+} no parecen estar regulados por mecanismos dependientes de AMPc (López-López et al., 1993; Pérez-García et al., 1991). La incubación con FSK o dibutilil AMPc durante los registros de CQCC de conejo aisladas en configuración *whole cell*, produce una inhibición del componente transitorio de la corriente de K^+ sensible a O_2 , mimetizando la acción de la hipoxia. Sin embargo, es importante señalar que el AMPc no es necesario para la inhibición de las corrientes de K^+ por la hipoxia, porque tal y como hemos mencionado, la hipoxia *per se* es capaz de reducir la P_o de los canales de K^+ sensibles a O_2 en parches de membrana en configuración *inside out* perfundidos en solución salina (Ganfornina y López-Barneo, 1991).

El efecto activador del AMPc sobre la maquinaria excitotóxica se manifestó al medir la liberación de CA inducida por ionomicina, un ionóforo de Ca^{2+} , ya que ésta era potenciada por FSK. Por el contrario, la FSK no aumenta la liberación de NT desencadenada por alto K^+_e , lo que sugiere que hay procesos adicionales, aún no definidos, que son dianas para el nucleótido o la PKA (Pérez-García et al., 1991).

Con todos estos hallazgos nuestro laboratorio propuso el modelo recogido en la **Figura 20** según el cual la disminución de la PO_2 activaría el sensor de O_2 inhibiendo la corriente de K^+ y activando la AC. La inhibición de la corriente de K^+ despolariza la membrana activando canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, conduciendo a la entrada de Ca^{2+} y al aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ que desencadena el proceso excitotico. El aumento de los niveles de AMPc puede modular la corriente de K^+ y la maquinaria excitotica de manera sinérgica.

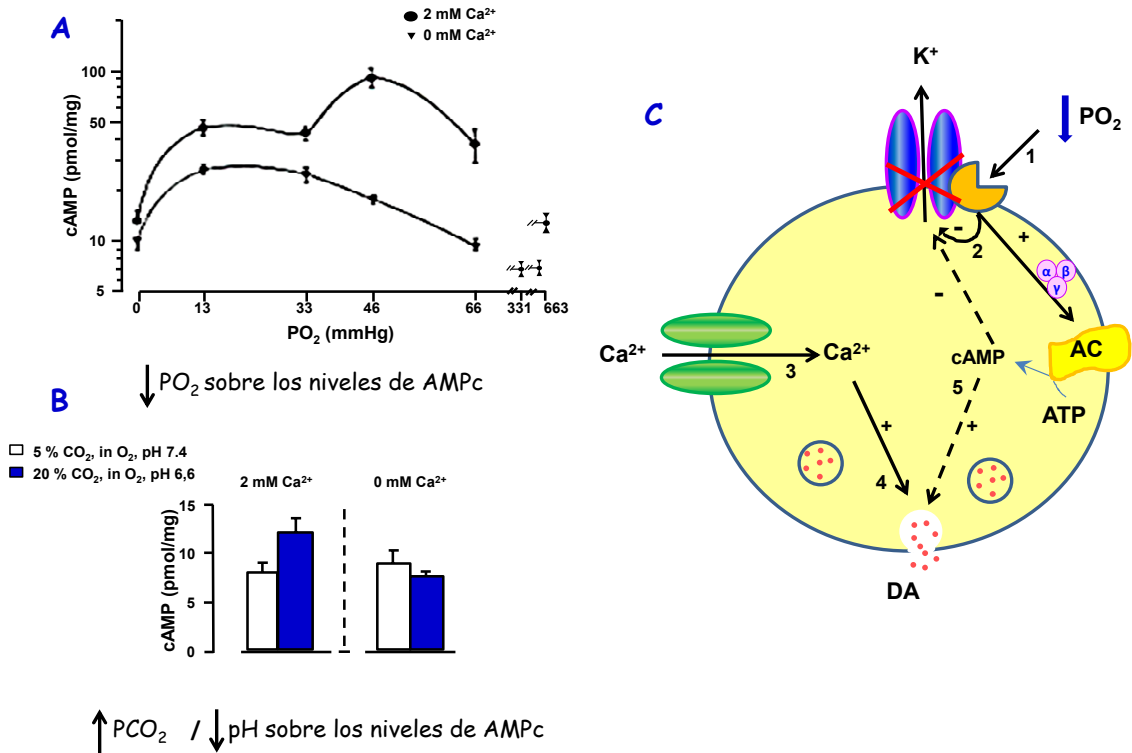


Figura 20. Mecanismos de transducción del estímulo hipóxico y ácido que implican la participación de AMPc en el CC. A. Efecto de la hipoxia sobre los niveles de AMPc, con y sin Ca^{2+} en el medio de superfusión. (Tomado de Pérez García et al., 1990). **B.** Efecto de la hipercapnia sobre los niveles de AMPc, con y sin Ca^{2+} . (Tomado de Pérez García et al., 1990). **C.** Modelo de transducción del estímulo hipóxico propuesto por nuestro grupo según el cual el AMPc modula la inhibición de las corrientes de K^+ sensibles a O_2 y facilita la liberación de NT. (Tomada de Cachero, 1994, Tesis Doctoral).

En cuanto a la implicación de las proteínas G en el proceso de transducción acopladas a la activación de AC, nuestro laboratorio demostró que la activación global de proteínas G (mediante fluoruro), el bloqueo de los efectos mediados por proteínas G_i - G_o (con toxina pertússica; PTX) o la activación de las proteínas G_s (pretratamiento con toxina colérica; CTX) ejercen efectos diferenciales sobre la liberación de CA evocadas por estímulos despolarizantes, hipóxicos e

hipercápnicos en el CC de conejo; estos hechos son consistentes con la noción de que el acoplamiento estímulo-secreción para cada estímulo es diferente o, al menos, está modulado de forma diferente (Cachero et al., 1995).

Los mismos estudios mostraron que la estimulación hipóxica produce la activación de proteínas Gs y Go-Gi (Cachero et al., 1996) y que el aumento en los niveles de AMPc inducido por la disminución de la PO_2 en ausencia de Ca^{2+}_e se abole por el pretratamiento con PTX. Esto sugiere la presencia de una proteína Go-Gi acoplada positivamente a la AC o, alternativamente, a una proteína Gs y una proteína Go-Gi, de modo que las subunidades α_s canalizarían la activación de la AC con la participación de subunidades $\beta\gamma$ proporcionadas por proteínas Go-Gi (Cachero et al., 1995, 1996). Es necesario señalar que la cascada de transducción del estímulo hipóxico es compleja e implica la secreción de un gran número de NT. El CC contiene receptores de adenosina tipo A_2 que están acoplados positivamente a la AC y por tanto los aumentos en el AMPc asociados con la hipoxia podrían estar mediados por la liberación de adenosina endógena. Existe además evidencia de que las cascadas de transducción de los receptores de adenosina A_{2B} y los de dopamina D_2 convergen para controlar los niveles de AMPc en las CQCC y su velocidad de liberación de CA, de modo que los agonistas de los receptores de dopamina D_2 inhiben la producción de AMPc en el CC, y los agonistas de los receptores de adenosina A_{2B} la promueven (Conde et al., 2008). También puede hipotetizarse un acoplamiento a nivel de la membrana plasmática entre los receptores A_{2B} y D_2 : este acoplamiento disminuiría la afinidad de los receptores D_2 para la DA cuando los receptores A_{2B} estuvieran ocupados por adenosina.

El mecanismo de detección de CO_2 en el CC es desconocido. En rata, la acidosis despolariza, mientras que en conejo activaría el intercambio Na^+/H^+ y la reversión del intercambiador Na^+/Ca^{2+} con un aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ (Rocher et al., 1991). La identificación de una ACs en el CC (Nunes et al., 2009) ha sugerido que ésta podría ser un sensor de los cambios en la PCO_2 . Sin embargo, un estudio más reciente de los mismos autores indicaría que su papel fisiológico en la respuesta a la hipercapnia isohídrica es escaso (Nunes et al., 2013). Los resultados sugieren que los aumentos en los niveles de AMPc en respuesta a la hipercapnia isohídrica no pueden ser atribuidos a aumentos directos en la actividad de la ACs o ACtm

mediados por $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ que se traduzcan en cambios en el AMPc, PKA o frecuencia de descarga.

En un estudio previo de nuestro laboratorio (Rocher et al., 2009) se ha confirmado que la menor eficacia de la acidosis hipercápnica (20% CO_2 , pH 6.6) en promover una respuesta secretora de CA en comparación con la hipoxia moderada ($\text{PO}_2=46$ mmHg), a pesar de producir una mayor despolarización de las CQCC, se debe a que el AMPc que potencia la liberación hipóxica no potencia la liberación ácida hipercápnica, reforzado por el hecho de que la acidosis *per se* inhibe la exocitosis. Cabe recordar que sólo la hipoxia y no la acidosis hipercápnica aumenta los niveles de AMPc en el CC de forma independiente a la acción secundaria de los NT liberados (Pérez-García et al., 1990; Cachero et al., 1996; ver Pérez-García y González, 1997). El hecho de que la acidosis inhiba también las corrientes de Ca^{2+} explica los datos previos de otros laboratorios que sugieren que los niveles de Ca^{2+}_i alcanzados por la hipoxia y la acidosis hipercápnica son comparables, aunque el ácido produzca una despolarización mucho mayor (Rocher et al., 2009).

En este mismo estudio se ha descrito que los inhibidores de PKA no modifican la respuesta a la hipoxia mientras que la inhibición de la AC (con SQ-22536) reduce la respuesta en un 50% indicando que la potenciación en la liberación de CA mediada por AMPc es independiente de PKA (Rocher et al., 2009). Al unir el AMPc, los dominios GEF de Epac catalizan el intercambio de GDP por GTP en las proteínas G monoméricas activándolas y facilitando la exocitosis.

Éste es el primer estudio que implica a Epac en el control de la quimiorrecepción del O_2 y es el origen de la segunda parte de la presente Tesis Doctoral. Pensamos que la maquinaria excitotónica y los canales de K^+ son las posibles dianas para la regulación independiente de PKA mediada por AMPc-Epac durante la estimulación hipóxica. El hecho de que los análogos de AMPc (dibutiril cAMP) mimeticen el efecto de la hipoxia sobre las corrientes de K^+ en las CQ aisladas de conejo (López-López et al., 1993) evidencia una posible diana para el Epac. En CQ se pueden excluir otras dianas de Epac tales como los canales de Ca^{2+} y los depósitos intracelulares de Ca^{2+} ya que los análogos de AMPc no modifican las corrientes de Ca^{2+} (López-López et al., 1993) y los depósitos intracelulares no contribuyen a controlar el Ca^{2+} libre (Vicario et al., 2000 b; Conde et al., 2006 b).

Los canales aniónicos (Carpenter y Peers, 1997) y las *gap junctions* (Eyzaguirre, 2007) en las CQ también están regulados por AMPc, aunque por el momento no se conoce si esta regulación es dependiente o independiente de PKA.

Finalmente queremos destacar el papel del AMPc en los cambios adaptativos que la HC parece ejercer sobre el CC: la exposición a HC, como la que sucede en individuos viviendo a grandes alturas o con patologías pulmonares, produce cambios importantes en la morfología y funcionalidad del mismo. Ello va asociado con cambios ventilatorios de carácter adaptativo desencadenados por una sensibilización del reflejo quimiorreceptor. Varios grupos han investigado las diferencias electrofisiológicas de las CQ en cultivo en dichas condiciones. Por ejemplo, el grupo de Nurse ha descrito hipertrofia celular y un aumento de la densidad de corrientes de Na⁺ en CQ de cultivos expuestos a hipoxia (Stea et al., 1992). Dicho efecto es reproducido por análogos permeables de AMPc, tales como el dibutilil AMPc y por activadores de la AC tal como la FSK. También se han descrito remodelaciones en los canales de Ca²⁺ (Hempleman, 1996) y aunque no se conocen los mecanismos por los que ocurren estos procesos, se ha propuesto que los efectos de la HC aumentando la excitabilidad eléctrica y la movilización de Ca²⁺ en las CQ que potencian la quimiosensibilidad del CC durante la aclimatación a la hipoxia pueden estar también mediados por AMPc (Stea et al., 1992).

Objetivos

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Este trabajo de Tesis Doctoral es continuación de estudios previos realizados en el laboratorio sobre la cascada de señalización implicada en la respuesta hipóxica en dos tipos celulares que poseen sensibilidad a la hipoxia fisiológica: las células quimiorreceptoras del CC y las CML de los vasos pulmonares. Conceptualmente, la estrategia experimental que hemos seguido ha consistido en variar las condiciones de O₂ ambiental y estudiar aquellos parámetros que considerábamos pudieran ser importantes en la génesis de las respuestas. Hemos utilizado dos modelos experimentales en rata en los que nos hemos hecho preguntas distintas, que constituyen dos grupos de objetivos bien diferenciados. En el primer modelo hemos expuesto a los animales durante el periodo perinatal a hiperoxia, con concentraciones de O₂ comprendidas entre un 55-60%, como aquellas encontradas en oxigenoterapia infantil aplicada en niños prematuros. En el segundo modelo se ha expuesto a animales adultos, durante una semana, a atmósferas con concentraciones del 10-11% de O₂. Aunque la atmósfera utilizada es normobárica, su bajo contenido en O₂ mimetiza los ambientes hipóbaricos encontrados a grandes alturas, y dado que el resultado inmediato de nuestra maniobra experimental es producir una hipoxia hipóxica, podría también aceptarse que mimetiza el aspecto clave, la hipoxia, de la EPOC.

Para el primer modelo, utilizando animales expuestos a **hiperoxia perinatal**, los objetivos específicos han sido:

1. Valorar en el animal adulto *in vivo* el efecto de la exposición perinatal a atmósferas hiperóxicas sobre la VPH.
2. Analizar el estado redox de los animales y el efecto de la suplementación con antioxidantes sobre la respuesta vasoconstrictora y los posibles mecanismos implicados en dicha respuesta.
3. Analizar el efecto de la suplementación con antioxidantes sobre la funcionalidad del CC y su control sobre la ventilación.

Respecto al segundo modelo, utilizando animales expuestos a **hipoxia crónica**, los objetivos específicos han sido:

1. Caracterizar los efectos de la exposición a hipoxia crónica sobre la funcionalidad de las CQ del CC analizando la participación del AMPc en los cambios funcionales observados.
2. Caracterizar las vías de señalización activadas por AMPc: vía de la PKA y vía del Epac, y su participación en la respuesta secretora del CC activada por hipoxia y por acidosis hipercápnica.
3. Analizar la posible implicación de la vía de señalización del AMPc en la potenciación de la respuesta del CC ante la exposición simultánea a hipoxia y a acidosis hipercápnica.

Material y métodos

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

1.1 Consideraciones generales

Todos los experimentos de esta Tesis Doctoral han sido realizados utilizando como animal de experimentación ratas Wistar en condiciones de T^a comprendidas entre 20-23°C, sometidas a ciclos de luz-oscuridad de 12 horas y alimentadas *ad libitum*. Mientras que para los experimentos de HC todos los animales contaban con ≈3 meses de edad, que se supone que es el tiempo en el que alcanzan el estado adulto (peso ≈ 250-350 g), para los experimentos llevados a cabo en condiciones de hiperoxia, las edades de dichos animales oscilaban dentro de 2 grupos diferentes: 7 y 90 días, con el objetivo de comparar los efectos de la hiperoxia en las etapas iniciales del desarrollo frente al estado adulto.

Ocasionalmente, se han aplicado tratamientos de hipoxia crónica intermitente (HI) para su comparación con hipoxia crónica sostenida (HC) en animales adultos (3 meses o 3 meses y medio).

1.2 Tratamientos experimentales

Tanto el tratamiento de hipoxia crónica sostenida, como el de hiperoxia perinatal fueron realizados dentro del laboratorio en un cuarto especial adaptado para dichos fines, que cuenta con una cámara de dimensiones 120 × 50 × 25 cm (**Fig. M1**) totalmente transparente, con una tapa ajustable, una entrada de aire, que permite la regulación de las condiciones de PO₂ en la misma, ya que va conectada a distintas bombonas de gases (según sea el tratamiento), así como a una salida para evitar la acumulación de CO₂. En ambos tratamientos se utilizaron grupos de animales controles de la misma edad, que sirvieron de referencia para las distintas medidas experimentales. El tratamiento de hipoxia intermitente también se realiza en el mismo cuarto, pero en cámaras diferentes tal y como se explica más tarde.

1.2.1 Hiperoxia perinatal (H):

Para la realización de estos experimentos se precisó la utilización de un gran número de camadas de animales ya que eran necesarias crías nacidas en ambientes

hiperóxicos. Estos animales fueron obtenidos mediante el apareamiento y posterior selección de las futuras madres, que fueron aisladas en jaulas desde el comienzo del embarazo, y se introdujeron dentro de la cámara en la última semana del mismo, con una elevada concentración de O₂ (55-60% de O₂) con el fin de que las crías nacieran en un ambiente hiperóxico y estuvieran en estas condiciones hasta el primer mes de edad, momento a partir del cual, tanto los animales controles (aquellos nacidos de madres preñadas el mismo día, pero expuestos a condiciones normóxicas) como los experimentales, fueron trasladados al animalario general hasta la fecha de realización de los experimentos (Figura M1).

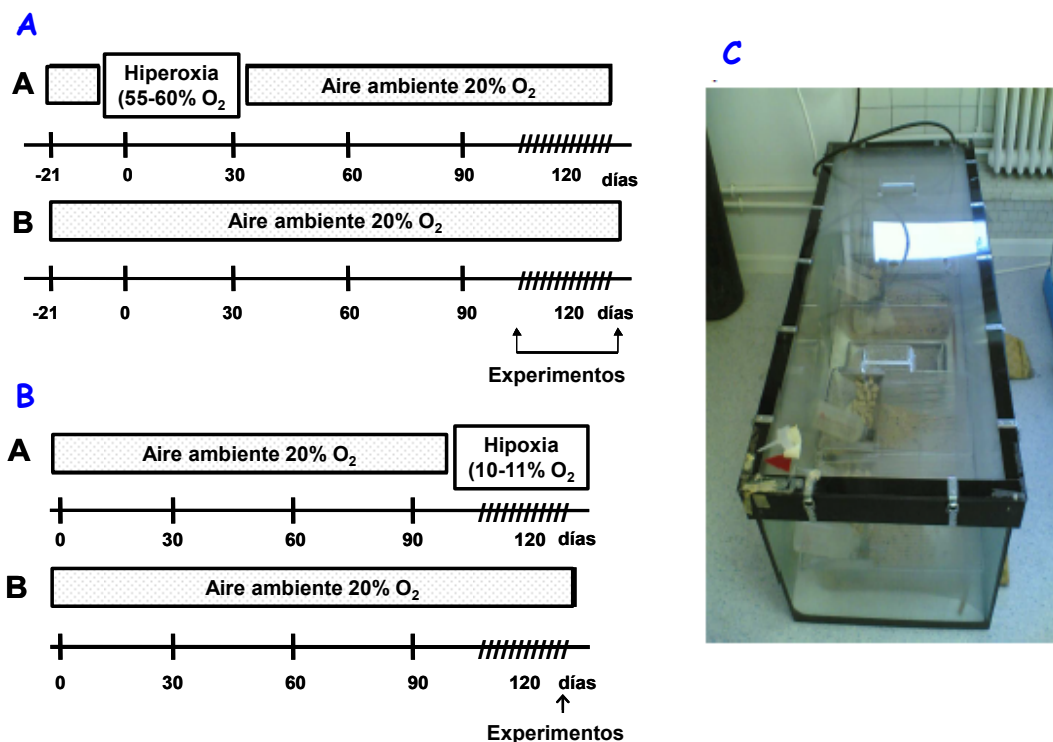


Fig. M1. Esquema explicativo que muestra el protocolo experimental para los dos modelos experimentales: A) Animales expuestos a hiperoxia perinatal; B) Animales expuestos a hipoxia crónica sostenida; En ambos casos frente al control; C) Cámara empleada para ambos tratamientos, conectada a un sistema de balas que varía según el tratamiento.

Para estudiar los efectos de la suplementación con ácido lipoico (AL; 1g/Kg comida, mezcla racémica), y vitamina E (400 mg/Kg comida) y su posible papel protector frente al estrés oxidativo, provocado teóricamente por la presencia incrementada de ROS debido a la hiperoxia perinatal, se introdujo un nuevo grupo experimental hiperóxico suplementado (HS), obtenido por suplementación de los

animales hiperóxicos con dicha dieta durante el periodo en que estaban expuestos al tratamiento (es decir desde el nacimiento hasta el primer mes de edad).

1.2.2 Hipoxia crónica (HC):

Se introdujeron los animales adultos en la cámara en condiciones de hipoxia normobárica (10-11% O₂, PO₂ ≈ 80 mmHg) durante un periodo de 7 días.

Aspectos comunes para ambos tratamientos

Dentro de la cámara utilizada para ambos tratamientos, la mezcla de gases (aire y O₂ para HC o bien aire y N₂ para hiperoxia perinatal) fue perfundida a un flujo constante de unos 3 l/min. Para evitar la acumulación de CO₂ y vapor de agua se utilizaba soda lima con viraje blanco-violeta que indicaba la saturación por CO₂, así como una renovación del aire a través de la salida. La apertura de la cámara para la limpieza y reposición del alimento y agua, se realizaba cada 3-4 días en el menor tiempo posible, aproximadamente una media hora, empleando tras la misma un flujo elevado para conseguir de nuevo una PO₂ del 55-60% O₂ para hiperoxia o del 10-11% O₂ para HC, en un tiempo menor a 20 minutos. La PO₂ fue monitorizada en estos tiempos claves con un oxímetro (Sensor Oxyding, Drager, Lubeck, Alemania).

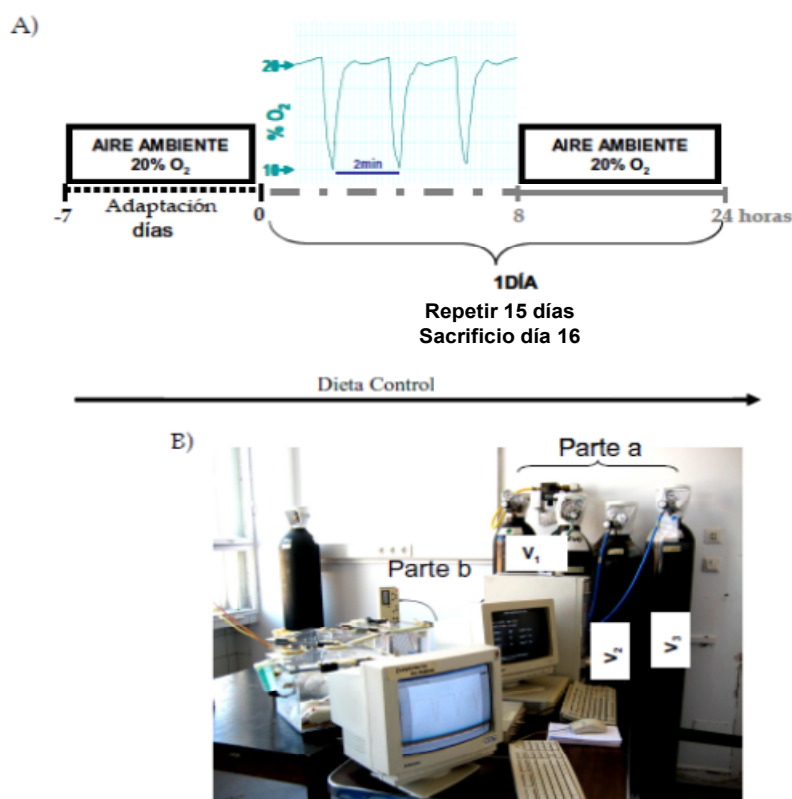
1.2.3 Hipoxia intermitente (HI):

Las cámaras empleadas para la HI tienen unas dimensiones de 34 × 28 × 20 cm. Como se aprecia en la **Figura M2**, el sistema consta de 2 partes: **A)** 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 que se encuentre el experimento. Con la válvula 1 se consigue que en el punto más bajo del ciclo se llegue a una hipoxia de ~ 10-11% O₂. La válvula 2, conectada a una bala de aire de alto flujo, permitirá restablecer en el menor tiempo posible la situación de normoxia (20-21% O₂) y la válvula 3, es la encargada de mantener ese porcentaje hasta el comienzo del ciclo siguiente. La parte **B)** consta de un detector de oxígeno (oxímetro) conectado a una de las cámaras, cuyo registro es llevado a un programa de adquisición de datos que nos

permite ver a 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 HI fue el siguiente: Normoxia (20-21% O₂), 80 s; Episodio hipóxico (10-11% O₂, PO₂ ≈ 80 mmHg), 22 s.; Restablecimiento de la situación de normoxia, 18s

Este patrón de ciclos se repitió cada 2 minutos durante las 8 horas de sueño de los animales. Una vez transcurrido ese tiempo, los animales fueron devueltos a sus jaulas y se mantuvieron las 16 horas restantes del día en situación de aire ambiental (21% O₂) hasta el día siguiente. La duración del protocolo experimental fue de 15 días (ver **Figura M2**).



1.3 Procedimientos quirúrgicos

Las ratas fueron pesadas y posteriormente anestesiadas con pentobarbital sódico mediante inyección intraperitoneal (60 mg/Kg). Según el tratamiento se extrajeron distintos tejidos:

Para el grupo H e HS, se realizó extracción de sangre, de CC, así como de diferentes tejidos (cerebro, hígado, pulmón). La sangre se obtuvo por punción intracardiaca y fue recogida en tubos heparinizados, centrifugada a 4000 rpm × 10 min a 4°C para separar el plasma, que es inmediatamente recogido y conservado a -80°C hasta su utilización. Para la extracción de los CC, las ratas anestesiadas fueron sometidas a una traqueotomía, tras la cual se extrajeron las bifurcaciones de las arterias carótidas, que se disecaron en una cámara de lucita con una solución Tyrode cirugía a 0-4°C [NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfónico (HEPES 10 mM) y glucosa 5 mM (pH 7.4 ajustado con NaOH)] equilibrada con 100% O₂ eliminando todos los restos de tejido conectivo que rodeaban al CC. Los tejidos extraídos fueron lavados con una solución salina de NaCl 0.9% heparinizada, secados en papel de filtro humedecido, congelados en N₂ líquido y guardados en crio viales a -80°C hasta el momento de realizar las determinaciones.

Para el grupo hipóxico crónico (HC), se extrajeron fundamentalmente los CC, así como tejidos controles tales como cerebro y ganglio cervical superior (GCS) para la realización de Western Blot. Los CC fueron extraídos con un protocolo similar al utilizado en el grupo H. Los CC destinados a experimentos de liberación de CA así como de síntesis, o bien de disociación de células, fueron utilizados en fresco, mientras que aquellos tejidos cuya finalidad era la extracción de proteínas para realización de Western Blot fueron inmediatamente congelados en N₂ líquido y conservados a -80°C hasta su utilización.

En cuanto al grupo hipóxico intermitente (HI), se extrajeron los CC de igual modo que para los dos grupos anteriores.

Finalmente, una vez extraídos los tejidos, los animales fueron sacrificados con una sobredosis intracardiaca de pentobarbital. El Comité institucional de la

universidad de Valladolid para el cuidado y uso animal aprobó todos los protocolos llevados a cabo.

2. PLETISMOGRAFÍA DE CUERPO COMPLETO

En ratas seleccionadas de cada grupo control y experimental se midieron los parámetros ventilatorios mediante un pletismógrafo de cuerpo completo (EMKA Technologies). Los experimentos se realizaron a los 7 días de tratamiento hipóxico crónico o bien al mes de tratamiento hiperóxico. El sistema consta de una serie de cámaras cilíndricas de metacrilato, de unos 2.5 litros de capacidad con un flujo de aire continuo de 2 l/min conseguido por un caudalímetro (Key Instruments). De forma breve, una rata en libre movimiento, era colocada en la cámara del pletismógrafo 30 min antes del experimento, en condiciones de aire ambiental, para que se adaptara al medio y permitiera la obtención posterior de parámetros ventilatorios en reposo. Continuamente se suministraba aire fresco con un flujo de 2 l/min. Tras esto, se sometía a los animales a diferentes mezclas de gases. Tras la selección de aquellos periodos donde los animales ventilaban de un modo estable, se analizaron la frecuencia respiratoria, el volumen corriente (volumen tidal) y la ventilación total (volumen minuto). La salida del flujo se dirigía al espirómetro (EMKA Technologies), que enviaba 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 monitorizaban y almacenaban para visualización y posterior análisis (GraphPad Prism 4). La T^a en la cámara era monitorizada y mantenida dentro del rango neutro (22-26°C). La concentración de oxígeno también era continuamente monitorizada a través de una pequeña salida de las cámaras mediante un analizador de O_2 (Sensor Oxyding, Dräger, Lubeck, Alemania). Los protocolos específicos de estimulación con hipoxia o hipercapnia serán descritos en la sección de resultados.

3. REGISTRO DE PRESION ARTERIAL SISTÉMICA (PAS) Y PRESIÓN EN ARTERIA PULMONAR (PAP)

Las ratas fueron anestesiadas con ketamina (50 mg, administrados intraperitonealmente), traqueotomizadas y ventiladas con ayuda de una bomba (CL Palmer, Londres, Reino Unido) con una mezcla normóxica (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂) a una frecuencia de 40 ventilaciones/minuto y presión positiva espiratoria de 2 cm H₂O. El volumen tidal fue ajustado para una presión inspiratoria máxima de 10 cm H₂O.

La PAS se registró en la carótida donde se insertó un catéter conectado a un transductor de alta presión. Para el registro de la PAP se realizó una toracotomía mínima que permitió visualizar el corazón, y por punción directa a través de la pared del ventrículo derecho se introdujo una cánula muy fina que se avanzó hasta la arteria pulmonar (AP). La posición en AP se comprobó experimentalmente por el registro de PAP oscilante con valores máximos y mínimos esperables (si no se llega a la AP, la presión mínima es 0 a lo largo de toda la diástole). Como en el caso de la cánula se conectó a un transductor de baja presión. Los transductores se conectaron a una tarjeta de adquisición de datos (PowerLab16SP; ADI Instruments, Castle Hill, Australia) desde la cual la señal se enviaba al ordenador para su monitorización, almacenamiento y posterior análisis. La calibración de los transductores se realizó con un manómetro de mercurio.

Los registros de PAP comenzaron después de ventilar al animal con una mezcla normóxica durante varios minutos. Tras conseguir una línea basal normóxica estable (20% O₂, 5% CO₂, resto N₂) se pasa a emplear una mezcla hipóxica (2% O₂, 5% CO₂, resto N₂) durante el tiempo que dure el estímulo hipóxico (3 min). Transcurrido ese tiempo, se les administró de nuevo una mezcla de aire normóxica hasta restablecer los valores de PAS y PAP iniciales. De esta manera se pudo evaluar si la respuesta frente a la hipoxia, tanto a nivel sistémico como pulmonar, se encuentra alterada después del tratamiento HC, H o HS.

Para obtener datos sobre el valor de la vasoconstricción pulmonar producida por la hipoxia (VPH), se cuantificaron las diferencias en PAP restando la PAP pico durante el estímulo de la PAP basal (control).

4. ESTUDIOS ELECTROFISIOLÓGICOS

Para la realización de estos experimentos se llevó a cabo una colaboración con el Prof. Pérez-Vizcaíno de la Complutense de Madrid. En primer lugar se aislaron las pequeñas AP de resistencia (AP de 200-500 μm de diámetro interno) de ratas Wistar controles e hiperóxicas (250-300 g) y se disociaron con una solución salina fisiológica (SSF) que contiene (mM): NaCl 130, KCl 5, MgCl_2 1.2, CaCl_2 1.5, glucosa 10, HEPES 10 (pH 7.3 ajustado con NaOH). Para los ensayos fluorimétricos, los anillos fueron despojados de su endotelio y cortados a lo largo de su eje longitudinal en pequeños segmentos, mientras que para el aislamiento de las células, las AP desprovistas de endotelio fueron disociadas en una solución salina libre de Ca^{2+} (solución SSF libre de Ca^{2+}), cortadas en pequeños segmentos (aprox. 2 mm \times 2mm) y trasladadas a una SSF libre de Ca^{2+} que contiene en (mg/ml): papaína 1, ditiotreitól 0.8 y albúmina 0.7. Las células se almacenaron en SSF libre de Ca^{2+} (4° C) y se utilizaron dentro de las 8h siguientes.

Las corrientes de membrana se registraron con un Axopatch 200B y un Digidata 1322A (Axon Instruments, Burlingame, CA) utilizando la configuración de célula completa de la técnica de *patch clamp*. Las corrientes se normalizaron para la medida de la capacidad celular o capacitancia (C_m) y se expresaron como pA/pF. Para un registro óptimo de las corrientes de potasio (IKV), las células fueron superfundidas con una SSF externa libre de Ca^{2+} y una solución interna en la pipeta libre de Ca^{2+} que contiene (mM): KCl 110, MgCl_2 1.2, Na_2ATP_5 , HEPES 10, EGTA 10, pH 7.3 ajustado con KOH. Las corrientes eran evocadas tras la aplicación de pulsos despolarizantes de 200 ms desde -60 mV para evaluar los potenciales comprendidos entre -60 mV y +60 mV con incrementos de 10 mV. Todos los experimentos se llevaron a cabo a T^a ambiente (22-24°C).

Las ROS se evaluaron mediante el uso del colorante fluorescente DHE que detecta principalmente $O_2^{\cdot-}$. Los segmentos de AP desprovistos de endotelio se incubaron con DHE (10 μ M) durante 60-90 min y posteriormente se colocaron en la base de un microscopio invertido de fluorescencia (Leica DMIRB, Wetzlar, Alemania) cubiertos con una malla y superfundidos con SSF con un flujo de 2 ml/min. Las preparaciones se dejaron equilibrar durante 30 min y por último se iluminaron a través de la superficie luminal utilizando un filtro de paso de banda de 530 nm. La fluorescencia emitida se filtró utilizando filtros de emisión de paso largo de 610 nm. Las imágenes fueron tomadas a intervalos de 1 min con una cámara digital de color Leica DC300F y la fluorescencia se cuantificó utilizando el software *Image J*. Los valores de intensidad están expresados como un porcentaje de los valores iniciales después de restar el fondo. Una vez que los valores de fluorescencia eran estables (aproximadamente 5 min), las preparaciones se expusieron a solución hipóxica para comparar las respuestas tras el tratamiento hiperóxico perinatal (Frazziano et al., 2011).

5. DETERMINACIÓN DE ÁCIDO LIPOICO, TROLOX METIL ÉTER Y TOCOFEROLES EN PLASMA MEDIANTE HPLC Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON DETECCIÓN POR TRAMPA IÓNICA (HPLC-ESI-MS/MS)

La determinación de analitos mediante la técnica de HPLC-MS permite su cuantificación selectiva con alta especificidad, ya que se basa en una transición bien definida para cada metabolito que resulta de su patrón específico de fragmentación. Hasta la fecha, no existían informes sobre el análisis de espectrometría de masas de la familia de los distintos tocoferoles (Ts) de la vitamina E y/o del AL usando una configuración del analizador de trampa iónica, ya que el aparato de triple cuadrupolo es el que se elige comúnmente para fines analíticos. No obstante, debido a que este detector se puede utilizar para proporcionar información inequívoca sobre los fragmentos MS y MS/MS en muestras reales tanto operando en modo de escaneo de barrido completo como en modo de escaneo de los distintos fragmentos iónicos derivados a partir de un ion parental, nuestro objetivo fue verificar las capacidades de un analizador de trampa

iónica para medir α , β y γ tocoferol, Trolox metil éter (TME), un análogo sintético de la vitamina E y AL en plasma de rata. Los resultados de estos estudios proporcionan el primer método de análisis capaz de determinar todos estos analitos durante una única carrera cromatográfica utilizando HPLC-ESI-MS/MS y han dado lugar a un artículo donde se muestran los resultados obtenidos utilizando en este caso muestras de plasma humano (Montero et al., 2012).

Medidas de plasma

El plasma se obtuvo por centrifugación (4000 rpm \times 10 min \times 4 ° C) de muestras de sangre de ratas C, H e HS de 7 y 90 días de edad. Posteriormente la muestra se somete a un proceso de extracción líquido-líquido con acetato de etilo (3 veces \times 600 μ l), incluyendo un paso previo de precipitación de proteínas (con 200 μ l de ETOH), lavado de la fase orgánica en NaCl(s), secado a vacío o bajo chorro de N₂ y finalmente reconstitución en 200 μ l de MeOH. El rendimiento de la extracción se determinó por el método de la adición de un patrón según el cual se añadieron 1.00, 0.50 o 0.25 ng/ μ l de cada compuesto en 200 μ l de plasma. La adición post-extracción de los estándares a las muestras de plasma servía para evaluar las posibles interferencias en la fuente de ionización.

Cromatografía

Los análisis se realizaron en un sistema HPLC LaChrom Elite® HPLC de Hitachi-VWR, que estaba constituido por una bomba binaria-L 2130 equipada con un accesorio de gradiente de baja presión y un desgasificador en línea así como un muestreador automático L-2200. El efluente de la columna fue conectado a un espectrómetro con detector de trampa iónica. Las muestras se analizaron en una columna de tamaño de partícula de 3 μ m Atlantis® C18 2,1 \times 50 mm de Waters (Waters Cromatografía, SA, Barcelona, España) con una precolumna de ODS 4.6 \times 10mm, de Teknokroma (Barcelona, España).

Tabla M1. Gradiente de elución utilizado para el análisis de HPLC. El disolvente A era metanol (100%), y el disolvente B era metanol-acetato amónico (0.1%, pH 4; 9:1, v/v).

Tiempo (min)	Disolvente A (%)	Disolvente B (%)
0.0	0	100
2.0	98	2
6.0	98	2
9.5	0	100
12.0	0	100

Para la separación se utilizó un gradiente de elución de dos disolventes como el que se muestra en la **Tabla M1**, a una velocidad de flujo de 0.3 mLmin⁻¹, siendo el volumen de inyección de 50 µL.

Espectrometría de masas

Después de la separación en la columna, las muestras fueron detectadas y analizadas en un espectrómetro de masas de trampa iónica Esquire 6000 de Bruker Daltonics S.A (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), que estaba equipado con una fuente de ionización de electroespray (ESI). Los compuestos eran detectados en el modo negativo por reacción múltiple monitorizada (MRM) para las transiciones masa/carga (*m/z*) 205 → 171 para LA, *m/z* 429 → 163 para α-T, *m/z* 401 → 386 para δ-T, *m/z* 415 → 400 para γ-T y *m/z* 263→204 para TME. Se utilizaron estándares externos de cada compuesto para la cuantificación. Las soluciones estándar de cada compuesto fueron utilizadas en diversas concentraciones para la optimización de los parámetros del espectrómetro de masas, que se llevó a cabo utilizando los comandos y protocolos incorporados en el software del aparato (versión EsquireControl 5.3 ©, Bruker Daltonic GmbH), tanto para la ionización a [M- H]⁻ en modo MS (análisis completo) como para la fragmentación en modo MS/MS. Además fueron chequeados manualmente tanto diferentes temperaturas (250, 300 y 350 °C) como flujos de nebulización y de secado de N₂ con el fin de obtener la mayor intensidad iónica pseudo molecular negativa [M-H]⁻. Los valores de los parámetros del espectrómetro de masas utilizados en los análisis posteriores se muestran en la **Tabla M2**.

Tabla M2. Parámetros de espectrometría de masas utilizados en el análisis	
Parámetros de espectrometría de masas	Valor
Capilar	3500 V
Nebulizador	42.0 psi
Gas secado	8.5 lmin ⁻¹
T ^a secado	300°C
Rango de escaneo (<i>Scan</i>)	50-550 <i>m/z</i>
Tiempo de acumulación máximo	50.00 ms
Ionización de electroespray	Negativa

Cuantificación

El rango dinámico lineal se determinó a partir de al menos 9-11 inyecciones de cantidades conocidas para cada metabolito (n=33 a 36 medidas). Para la realización de estos experimentos se prepararon soluciones stock para cada analito disolviendo una cantidad pesada en el volumen apropiado de etanol y se almacenaban a -20 °C (1 mg/mL en etanol). A partir de los stocks disueltos en EtOH, se preparaban a diario diluciones estándar en metanol para realizar las medidas. Las correlaciones lineales del área del pico cromatográfico de la cantidad inyectada se determinaron utilizando el software Sigma Plot-2000 versión 6.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). El área del pico cromatográfico se calculó a partir del cromatograma del ion extraído (**Figura M3**) utilizando la herramienta de integración incluida en el software de análisis de datos de Bruker Daltonics S.A.

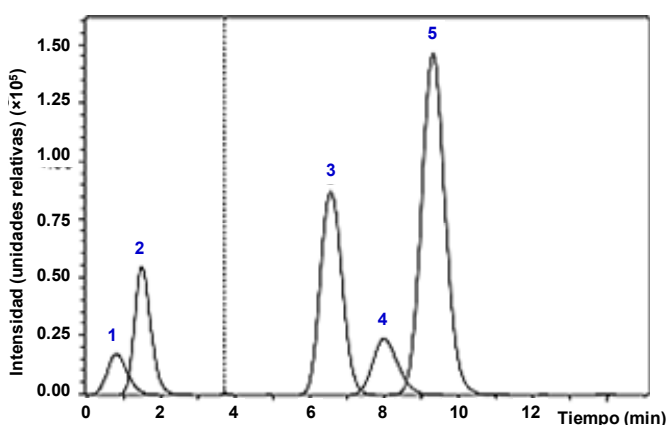


Figura M3. Cromatograma iónico de extracción típico obtenido para cada compuesto según el gradiente de elución mostrado. El valor entre paréntesis es la intensidad respectiva. Fueron inyectadas alícuotas de 200 ng de AL y de cada tocoferol así como 50 ng de Trolox metil éter. 1, AL (2.7×10^5); 2, Trolox metil éter (3.8×10^6); 3, δ -tocoferol (1.7×10^5); 4, γ -tocoferol (2.5×10^4); y 5, α -tocoferol (3.2×10^5). (Tomada de Montero et al., 2012)

Los valores m/z obtenidos en el espectro de fragmentación en el espectrómetro de trampa iónica se muestran en la **Tabla M3** para el AL, TME y Ts.

Tabla M3. Fragmentos obtenidos para el ion parental de cada compuesto en MS/MS. La intensidad relativa está indicada por el número entre paréntesis como el porcentaje del ion más abundante. El ion parental corresponde a [M-H].							
Compuesto	Ion parental			Fragmento iónico (abundancia relativa)			
AL	205 (5.3)	127 (0.5)	171 (100)				
TME	263 (<1.0)	163 (4.0)	189 (11.1)	204 (100)	219 (17.4)	248 (14.1)	279 (2.8)
α -T	429 (2.0)	135 (0.9)	163 (100)	414 (6.6)	427 (1.5)		
γ -T	415 (<1.0)	121 (1.9)	149 (52.8)	400 (100)			
δ -T	401 (<1.0)	135 (25.5)	386 (100)				

Teniendo en cuenta que el volumen de inyección en el equipo de HPLC-masas es de 50 µl de muestra y que una vez extraída la muestra se reconstituye en 50 µl de MeOH, para obtener la concentración de los distintos analitos en el plasma utilizamos la siguiente ecuación:

$$\text{N}^{\circ} \text{ gramos de analito/ml de plasma} = (\text{n}^{\circ} \text{ gramos de estándar}/50 \mu\text{l de MeOH}) \times V \text{ MeOH} \times (V \text{ acetato de etilo añadido}/ V \text{ acetato de etilo evaporado}) \times 5.$$

6. PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL ESTADO REDOX EN DIFERENTES TEJIDOS:

Preparación de las muestras

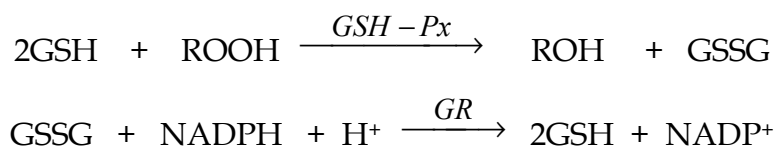
Los tejidos para la determinación enzimática de GPx se secan suavemente y se pesan añadiendo un volumen de tampón fosfato: $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 12.02 mM (pH 7.4) ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 1 mM), 10 veces su peso (w/v 1:10) para hígado y pulmón y 5 veces su peso (w/v 1:5) para cerebro. Se homogenizan en un homogeneizador OMNI-MIXER y se centrifugan a $3500 \text{ g} \times 10 \text{ min} \times 4^{\circ}\text{C}$. Los sobrenadantes se congelan a -80°C hasta el momento de realizar las determinaciones.

Los tejidos para la determinación de GSH y GSSG se secan suavemente y se pesan, añadiendo a continuación un volumen de sulfosalicílico al 5% (ASS) con una relación peso-volumen (w/v 1:5 para hígado y pulmón; 1:3 para cerebro) y se homogenizan en un OMNI-MIXER. El homogenizado se centrifuga $3000 \text{ g} \times 10 \text{ min}$ a 4°C . Se recoge el sobrenadante y en él se realiza la determinación del glutatión.

6.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA GPx

La actividad de la enzima GPx se determina por el método espectrofotométrico de Paglia y Valentine (1967). El ensayo se basa en la desaparición de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) en una reacción acoplada. En primer lugar, la GPx oxida GSH a GSSG en presencia de un

peróxido, y en segundo lugar, GSSG es de nuevo reducido a GSH por la glutatión reductasa (GR) usando NADPH como donante de equivalentes de reducción.



Previo al ensayo se realiza una dilución de la muestra en el buffer de homogenización (1/10 para hígado, 1/2 para pulmón y sin dilución en el caso de cerebro). La mezcla de reacción contiene 875 µl de buffer de trabajo (EDTA 1 mM, azida sódica 1 mM, GSH 1 mM, NADPH 0.2 mM y 1 UI/ml de GR en el buffer de homogenización) y 5-20 µl de muestra (ajustada hasta 100 µl con buffer de homogenización). La mezcla se preincuba durante 4 min a 37°C y la reacción se inicia al añadir 25 µl de solución de Terc-butil hidroperóxido (dilución 1:100 en el buffer de homogenización).

Se monitoriza la disminución de absorbancia a 340 nm y 37°C durante 1-2 min. Los blancos se miden en paralelo conteniendo todos los reactivos excepto la muestra de tejido.

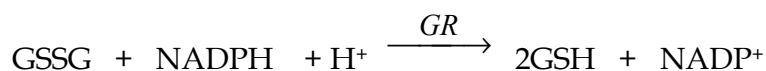
La actividad de GPx en la muestra (Δ absorbancia/min) se calcula en función del coeficiente de extinción molar (6220 UA/mol) para NADPH expresado como UI/g tejido (1 UI= 1 µmol/min/ml de mezcla de reacción).

6.2 VALORACIÓN DE GLUTATIÓN Y GLUTATIÓN OXIDADO

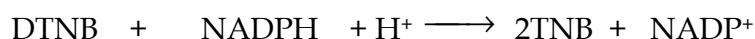
La valoración del glutatión se realiza usando el método de Griffith (1980) que consiste en un método enzimático cíclico colorimétrico en el cual se emplea la GR y que se basa en la oxidación del glutatión reducido (GSH) por el 5-5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) siguiendo la reacción:



La forma oxidada del glutatión (GSSG) actúa como sustrato para la GR empleando NADPH, de modo que se regenera el GSH, según la reacción:



Este paso enzimático es lo que da especificidad al ensayo, presentando además una alta sensibilidad (hasta 10^{-10} moles). Al final la reacción global será:



La concentración de los reactantes (DTNB, NADPH y GR) se escogió para obtener un incremento lineal de absorbancia durante 2 minutos. La pendiente de aparición del 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 standard que se usa para interpolar el glutatión total (GST = GSH + GSSG) presente en la muestra problema.

Las muestras se realizaron por duplicado, y la concentración de GSH, se obtuvo por diferencia entre GST total y el GSSG.

La determinación del GST total se realizó de la siguiente manera:

1. La mezcla de reacción contiene: 700 μl de una solución fresca de NADPH (0.3 mM) + 100 μl de solución DTNB (6 mM) + 195 μl de agua + 5 μl de sobrenadante homogenizado de la muestra.
2. Se calienta la mezcla de reacción durante 4 minutos a 37°C .
3. La reacción comenzó al añadir una unidad internacional (UI; 1 UI=1 $\mu\text{mol}/\text{min}$) de GR que previamente había sido disuelta en 5 ml de buffer fosfato (125 mM fosfato sódico, 6.3 mM EDTA, pH=7.5).
4. Mide a 412 nm el Δ absorbancia/min.

La determinación de GSSG se realizó con un paso previo de derivatización de las muestras, tomando 100 μl de sobrenadante del homogenizado y haciéndolo reaccionar con 2 μl de 2-vinil piridina. Posteriormente se ajusta el pH con 4 μl de tetraetilamonio (TEA) y se incuba 1 hora a T^a ambiente.

El resto del ensayo se realizó de la misma manera que para GST total, salvo que en este caso se utilizaron 20 μl de muestra y 4 UI de GR equilibrado todo ello

con 160 μ l de agua. Según el ciclo enzimático visto anteriormente, por cada molécula de GSSG se forman 2 moléculas de GSH, de modo que al determinar el GSH total se está evaluando: $GSH + 0.5 GSSG$.

El potencial redox se calcula con la ecuación de Nernst según la fórmula siguiente: $E_{GSH} = -240 - 30.7 \times \text{Log} [GSH]^2 / [GSSG]$.

7. WESTERN BLOT

La técnica de Western Blot o *immunoblotting* consiste en la detección y análisis de la expresión de distintas proteínas. Nuestro objetivo fue estudiar las distintas modificaciones sufridas por las mismas tras la exposición de los animales a HC.

Para la obtención de los extractos proteicos, se procedió a la homogenización en frío de los CC y otros tejidos de tipo no quimiorreceptor tales como GCS y cerebro, con un *buffer* de lisis que contenía detergentes así como inhibidores de proteasas. Una vez homogenizadas, las muestras fueron centrifugadas a 4°C y los sobrenadantes fueron mezclados con igual volumen de tampón de carga (SB 2 \times) conteniendo: Tris HCl 125 mM pH 6.8, 10% glicerol, 2% dodecilsulfato sódico (SDS), 5% β -mercaptoetanol y 0.02% de azul de bromofenol. Las muestras se hirvieron durante 3 minutos en baño seco y las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10% y un gel concentrador del 3%. Una vez finalizada la electroforesis (SDS-PAGE), las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF; ImmobilonTM-P, Milipore) 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 de Bio-Rad. Se bloqueó la membrana con 5% de leche desnatada en polvo diluida en TBS-T (*buffer* Tris salino 10 mM con 0.1% *Tween* 20), y se incubó con los anticuerpos primarios específicos anti-TH, anti-Epac-1, anti-Epac-2, anti-Ca_v1.2 y anti- β actina, utilizando esta última para normalizar las cargas en los distintos pocillos. Por último, tras los correspondientes lavados en TBS-T, las membranas se incubaron con los secundarios adecuados anti-Inmunoglobulina G (IgG), conjugados con

peroxidasa de rábano (HRP) (ver **Tabla M4** a continuación). Todos los anticuerpos fueron resuspendidos en TBS-T con 0.1% de albúmina sérica bovina (BSA) para bloquear las interacciones inespecíficas.

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

Tabla M4. Relación de los distintos anticuerpos utilizados para la determinación de la proteína Epac (1 y 2) y Ca_v1.2			
Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
Ratón anti β -actina (abcam)	1: 5000	Conejo anti IgG Ratón -HRP (abcam)	1: 10000
Conejo anti β -actina (abcam)	1:5000	Cabra anti IgG Conejo -HRP (abcam)	1:10000
Ratón anti Epac 1 (cell signalling)	1:100	Conejo anti IgG Ratón -HRP (abcam)	1:1000
Ratón anti Epac 2 (cell signalling)	1:100	Conejo anti IgG Ratón -HRP (abcam)	1:1000
Conejo anti Epac 1 (abcam)	1:100	Cabra anti IgG Conejo-HRP (abcam)	1:1000
Conejo anti Epac 2 (abcam)	1:100	Cabra anti IgG Conejo-HRP (abcam)	1:1000
Ratón anti Ca _v 1.2 (L) (abcam)	1:200	Conejo anti IgG ratón-HRP (abcam)	1:2000
Conejo anti Ca _v 1.2 (L) (Santa Cruz Biotechnology)	1:200	Cabra anti IgG Conejo-HRP (abcam)	1:2000
Conejo anti TH (Sigma Aldrich)	1:1000	Cabra anti IgG Conejo-HRP (abcam)	1:5000
Ratón anti TH (abcam)	1:1000	Conejo anti IgG ratón -HRP (abcam)	1:5000

Las densidades ópticas de las bandas correspondientes a tejidos experimentales se compararon con las de controles, previamente normalizados con

la banda de β -actina en ambos casos. Se calculó la media de todos los replicados y se aplicó el t-test de Student para determinar si el cociente de las densidades de los tejidos experimentales y de los controles era significativamente diferente.

Habitualmente tras un primer revelado de la membrana, se realizaba el *stripping* de la misma y se incubaba con un anticuerpo alternativo. El protocolo de *stripping* aplicado consiste en una incubación durante 40 minutos a 60 °C con 2 β -mercaptoetanol (100 mM) en un medio Tris- HCl (62.5 Mm, pH 6.8, SDS 2%), con lo que la membrana queda libre de anticuerpos y lista para ser reutilizada. En la **Tabla M4** se muestran los anticuerpos empleados y las diluciones utilizadas.

8. INMUNOCITOQUÍMICA

Se ha utilizado esta técnica para detectar la presencia o ausencia de las proteínas objeto de nuestro estudio y su co-localización con TH como medida de su expresión en las CQ.

Los CC son disociados enzimáticamente en 2 pasos consecutivos: en primer lugar se incubaron con 2ml de solución Tyrode 0 Ca²⁺, 0 Mg²⁺ que contiene colagenasa (2.5 mg/ml) y BSA (6 mg/ml) a 37°C durante 15 minutos y posteriormente, tras aspirar la solución con el enzima, se incubaron nuevamente con 2ml de la misma solución Tyrode conteniendo tripsina (1mg/ml) y albúmina (6 mg/ml) a 37°C durante 20 minutos. Se elimina la solución enzimática y se añaden 1.5 ml de medio de cultivo DMEM (Medio de Eagle modificado por Dulbecco; Sigma) a 4°C y mediante aspiraciones repetidas con una pipeta, se logra la disociación mecánica de los CC. Se centrifuga la muestra a 2000 rpm \times 8 min, tras los cuales, se elimina el sobrenadante y el *pellet* se resuspende en un volumen de 40-50 μ l aproximadamente de medio DMEM a 37°C. Se siembran las células disociadas en gota sobre *coverslips* recubiertos con poli-l-lisina (Sigma). Tras 2 h se añade 1 ml de DMEM a cada pocillo y se mantienen en el incubador a 37°C hasta su utilización.

Para identificar si las células que expresaban una determinada proteína eran o no quimiorreceptoras, se realizaron dobles inmunomarcajes usando TH como

marcador de las células tipo I. Los cultivos que contenían CQ se lavaron 3 veces con 1 ml de buffer fosfato salino (PBS; fosfato 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) para eliminar los restos de fenol del medio. Se fijaron las células con paraformaldehído al 4% en PB 100 mM en cantidad suficiente para cubrir completamente los cristales sembrados, dejándolos a T^a ambiente durante 10 min y se repitieron los lavados con PBS 10 mM. Previo a la incubación con los anticuerpos, las células se incubaron durante 30 min con solución de permeabilización-bloqueo (PB 10 mM, NaCl 0.6 M, Tritón X-100 0.1% y 2% de suero de cabra no inmunizada) para permeabilizar las mismas y así facilitar la entrada del anticuerpo y bloquear las uniones inespecíficas. Después del bloqueo y permeabilización se procede a la incubación secuencial con los anticuerpos (que son los mismos que hemos utilizado para el Western Blot; **Tabla M4**), previamente diluidos en la propia solución de bloqueo. La incubación con los anticuerpos primarios frente a TH (dilución 1:1000), Epac 1 y 2 (1: 50) y Ca_v1.2 (1: 50) se realizó a 4 °C durante toda la noche. Después de varios lavados con PBS 10 mM, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios marcados con sus respectivos fluoróforos durante 1 hora en oscuridad y a T^a ambiente. El doble marcaje utilizado consistía en: Alexa 594 (rojo) para localizar TH en las células tipo I e Isotiocianato de fluoresceína (FITC, verde) (dilución 1:1000 para ambos) para evaluar la posible colocalización en la expresión de nuestras proteínas de interés, además de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (1:8000) para ver la tinción de los núcleos. Tras otro ciclo de lavados, los cristales fueron montados sobre portas en medio acuoso con Vectashield H-100 (Vector Laboratories). También se realizaron controles negativos, incubados y tratados de modo similar a las muestras salvo por la ausencia de anticuerpo primario en los mismos. Por último las preparaciones se examinaron con un microscopio confocal de fluorescencia (Zeiss Axioscop 50 mot *plus*) equipado con filtros de emisión y excitación para FITC y Alexa 594, utilizando un objetivo de 60X y aumentos de 20 y 40X a las distintas muestras. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital refrigerada Photometrics, modelo CoolSnap-cf y analizadas con el programa informático *Metamorph* 6.3.

9. MEDIDA DE LA RESPUESTA SECRETORA DEL CC

Para el estudio de la respuesta *in vitro* de los CC a los diferentes estímulos, hemos medido la liberación de CA, marcando isotópicamente sus depósitos con tirosina tritiada (3,5 ³H-Tyr), el precursor natural de su síntesis. Dado el elevado recambio de las mismas en el CC, una cantidad importante de los depósitos quedan marcados radioactivamente (Fidone et al., 1982 b; Fidone y González, 1982). A continuación se describe como realizamos estos experimentos.

Los CC de rata aislados y frescos se incuban en viales de vidrio con solución Tyrode (250 µl) conteniendo tirosina tritiada (3,5 ³H-Tyr, concentración de 30 µM, y actividad específica 45 Ci/mmol, Amersham Ibérica, Madrid) y DL- metiltetrahidro-biopterina (0.1 mM) y ácido ascórbico (1mM) como cofactores para TH y dopamina β- hidroxilasa, equilibrada con O₂, en un baño metabólico a 37 °C durante 2 horas.

Tras las dos horas de incubación con ³H-Tyr, los CC son transferidos individualmente a viales de vidrio donde son lavados con una solución Tyrode-bicarbonato sin precursores ni cofactores (NaCl 116 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1.1 mM, glucosa 5 mM, HEPES 10 mM, NaHCO₃ 24 mM) durante 1 hora. Se mantienen en agitación a 37 °C y se renueva la solución cada 20 min para facilitar el lavado del precursor radiactivo. Las soluciones de incubación son continuamente gaseadas con 20% O₂, 5% CO₂, resto N₂ saturado con vapor de agua, quedando el medio ajustado a pH 7.4.

Tras los lavados comienza el experimento de liberación como tal. Los CC se mantienen a 37°C con el mismo gaseo, salvo cuando el estímulo es hipoxia o acidosis hipercápnica, aplicándoles los diferentes estímulos con su curso temporal apropiado. Cada 10 min se va recolectando las soluciones de perfusión y reponiendo el volumen con solución fresca (mediante jeringas) para el análisis posterior de CA. Las soluciones recolectadas son acidificadas a pH 3.2 con una mezcla de ácido acético glacial y ácido ascórbico para evitar la degradación de las CA y se guardan a 4°C para su posterior análisis en un contador de centelleo. Generalmente nuestros protocolos de liberación se componen de dos ciclos de hipoxia, S1 y S2. Previo a la aplicación del estímulo S1 se colectan dos fracciones

controles correspondientes a los medios de incubación equilibrados con 20% O₂, 5% CO₂, resto N₂.

La fracción representada por S1 corresponde al primer estímulo que puede ser un medio de incubación hipóxico (% O₂ < 20%, generalmente del 7% de O₂), rico en K⁺ (35-60 mM) o acidosis hipercápnica (20% O₂, 20% CO₂, resto N₂) aplicados durante 10 min. En las soluciones con alto K⁺, cantidades equimolares de Na⁺ son reemplazadas por K⁺ para mantener la osmolaridad constante. La aplicación de cada estímulo va seguida de 4 periodos de incubación de 10 min denominados post-estímulos en los que el medio está equilibrado con la mezcla de gases control (20% O₂, 5% CO₂, resto N₂). Habitualmente el estímulo S2 es el mismo que el S1 pero en los CC del grupo experimental el S2 se aplica en presencia de alguna droga cuyos efectos se querían probar tanto sobre la basal (10 min previos al estímulo) como durante la aplicación del estímulo propiamente dicho. En estos casos el efecto de dicha droga se evalúa comparando el cociente S2/S1 en términos de la liberación evocada por cada estímulo (liberación por encima de la liberación basal) en CC controles frente a CC experimentales. Los resultados se expresan como % de la liberación obtenida en los CC controles, asumiendo que las diferencias en dicho cociente en los CC experimentales son debidas al efecto de la droga.

El análisis de las ³H-CA presentes en las soluciones colectadas durante el experimento, se basa en la capacidad de la alúmina ácida para adsorber ³H-CA y sus catabolitos con estructura catecol, a pH alcalino y la posibilidad de eluirlos a pH ácido (Fidone et al., 1982 a, b; Fidone y González, 1982). La alúmina ácida (100 mg, BioRad) se añade a los viales que contienen las soluciones recolectadas y posteriormente se alcaliniza a pH 8.6 con buffer Tris 2M. A este pH la alúmina adsorbe los catecoles con gran afinidad. La alúmina se transfiere a columnas de vidrio, se lava con agua destilada para arrastrar cualquier otro producto retenido y finalmente se eluyen las CA sobre viales de centelleo con HCl 1N al que se añade líquido de centelleo (Optiphase "Hisafe" 3, perkin Elmer) previo a introducir las en un contador de tipo beta. Una vez finalizado el experimento, los CC se homogenizan a 4 °C con ácido perclórico (PCA) 0.4 N en un homogenizador cristal-cristal y se centrifugan durante 5 min a 14000 g a 4°C para medir CA residuales presentes al final del experimento.

En la **Figura M4** se muestra un protocolo de liberación típico, donde cada barra representa la liberación de ^3H -CA en un periodo de 10 minutos, durante el cual los CC estaban incubados con una solución equilibrada con 20% O_2 (normoxia, barras blancas) o con 7% O_2 (hipoxia, barras azules).

La liberación basal corresponde al área bajo la línea punteada mientras que la liberación producida por los estímulos es todo aquello que queda por encima de esta línea (liberación evocada). Nótese la diferencia de escala entre las **Figuras M4A** y **M4B** que representan, respectivamente, medias de liberación en 12 CC controles (C) y 12 CC de animales HC de 7 días.

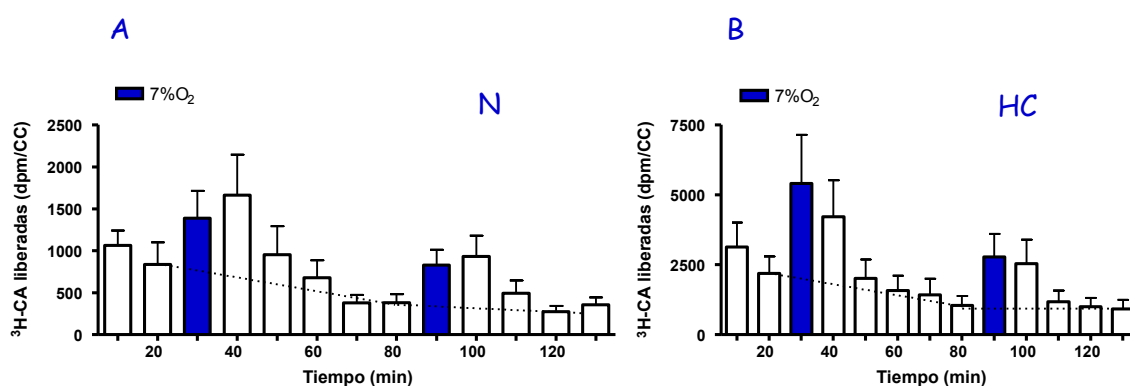


Figura M4. Comparación de la respuesta secretora a la hipoxia. En la figura se muestran dos picos de estimulación hipóxica sucesivos (7% O_2) en CC de animales normóxicos control (A) vs CC hipóxicos crónicos de 7 días (B). Nótese la diferencia de escala en ordenadas. Los valores son medias de 12 CC \pm SEM.

10. MEDIDA DE AMPc

Tras la extracción de los CC tanto de animales controles como experimentales, éstos se preincubaban individualmente *in vitro* dentro de un baño metabólico utilizando viales de vidrio que contienen una solución Tyrode-bicarbonato (NaCl 116 mM, KCl 5 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 1,1 mM, glucosa 5 mM, HEPES 10 mM, NaHCO_3 24 mM) ajustada a pH 7.4 por gaseo con carbógeno (95% O_2 /5% CO_2) durante 30 min. Las soluciones que bañaban los CC fueron posteriormente renovadas por un buffer de incubación nuevo que fue gaseado durante 20 min con condiciones controles (95% O_2 /5% CO_2) o hipóxicas (7% O_2 /5% CO_2 , resto N_2) para posterior comparación entre los grupos, en presencia de IBMX 0.5 mM. Una vez finalizado el tratamiento, los CC fueron extraídos y sumergidos

en ácido tricloroacético (TCA) al 6% (w/v) (150 µl) a 4 °C durante 30 min, para posteriormente ser homogenizados y centrifugados a 2000 x g durante 15 min a 4°C. Se recoge el sobrenadante descartando el *pellet*, y se somete a un proceso de extracción líquido-líquido 4 veces con 500 µl de agua saturada con dietiléter. La capa superior orgánica con el éter se desecha después de cada lavado y la fase acuosa se liofiliza. Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta la cuantificación del AMPc, momento en el cual se reconstituyen en un buffer de ensayo con acetato 0.05 M, pH 5.8 y albúmina bovina 0.01% para proceder ya al ensayo en placa que se realiza con un kit comercial de Healthcare Biosciences (EIA, RPN 2255, GE Healthcare Biosciences) y que lleva adherido el anticuerpo específico contra el complejo AMPc-peroxidasa conjugado. Se prosiguió con el ensayo siguiendo con el protocolo del fabricante que de forma breve consiste en la preparación de una curva patrón que cubre el rango de 12.5 a 3200 fmol/pocillo. Tanto las muestras como los estándares se han medido por duplicado y se han dejado también pocillos para el blanco (que no contiene ni el antiserum anti-AMPc, ni la enzima AMPc-peroxidasa) y la unión no específica (que no contiene el antiserum pero sí la enzima AMPc-peroxidasa). Posteriormente se mide la absorbancia en un lector de placas y se obtiene el porcentaje de unión para cada estándar y para cada muestra (% B/B₀) como un tanto por ciento de la absorbancia de las muestras con respecto a la del estándar cero, teniendo en cuenta la absorbancia de la unión no específica:

$$\% B/B_0 = [(Absorbancia \text{ de la muestra o estándar} - Absorbancia \text{ de la unión no específica}) / (Absorbancia \text{ del estándar cero} - Absorbancia \text{ de la unión no específica})] \times 100$$

Se representa % B/B₀ frente al logaritmo de la concentración de AMPc, lo que permite el cálculo por interpolación, de la concentración de AMPc en la muestra.

Los protocolos experimentales, encaminados a estudiar los cambios en los niveles de AMPc con la hipoxia, consisten en renovar las soluciones con Tyrode-bicarbonato en las que el gaseo con carbógeno se sustituye por 7% O₂/5% CO₂, con la adición en algunos casos de drogas específicas (SQ, KH7). Para el estudio de la variación de los niveles de AMPc con el estímulo ácido hipercápnico, se han utilizado otras dos disoluciones diferentes: un Tyrode sin bicarbonato (NaCl 140

mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1.1 mM, Glucosa 5 mM, HEPES 10 mM) para los puntos 0% bicarbonato, gaseados con 40% O₂/resto N₂ y un Tyrode especial 96 mM de bicarbonato obtenido por sustitución isosmótica de NaCl por NaHCO₃, gaseado con 40% O₂/20% CO₂.

Los resultados fueron expresados en valor absoluto en fmoles de AMPc o de una forma normalizada como picomoles de AMPc por miligramo de tejido.

11. MÉTODOS ESTADÍSTICOS Y PRESENTACIÓN DE DATOS

Los datos habitualmente se expresan como media \pm SEM de los valores obtenidos y la significación de la diferencia de medias se estableció mediante t -test de Student para datos apareados o sin aparear según los diseños experimentales y análisis de la varianza (ANOVA) "One way y two way ANOVA Student-Newman-Keuls/Bonferroni Method respectivamente" 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 consideraron significativas aquellas diferencias que arrojaron un valor de $p < 0.05$. Con frecuencia también mostramos experimentos únicos con el objetivo de facilitar la comprensión de los diseños experimentales y mostrar los cursos temporales de las respuestas.

Resultados

1. EFECTOS DE LA HIPEROXIA PERINATAL SOBRE LA RESPUESTA A LA HIPOXIA AGUDA DEL CC Y DE LA CIRCULACIÓN PULMONAR

Dado que la Tesis Doctoral de Prieto Lloret (2005) constituye el punto de partida de nuestro trabajo, en la **Figura R1** resumo los datos que considero especialmente relevantes y útiles para la presentación de nuestros experimentos.

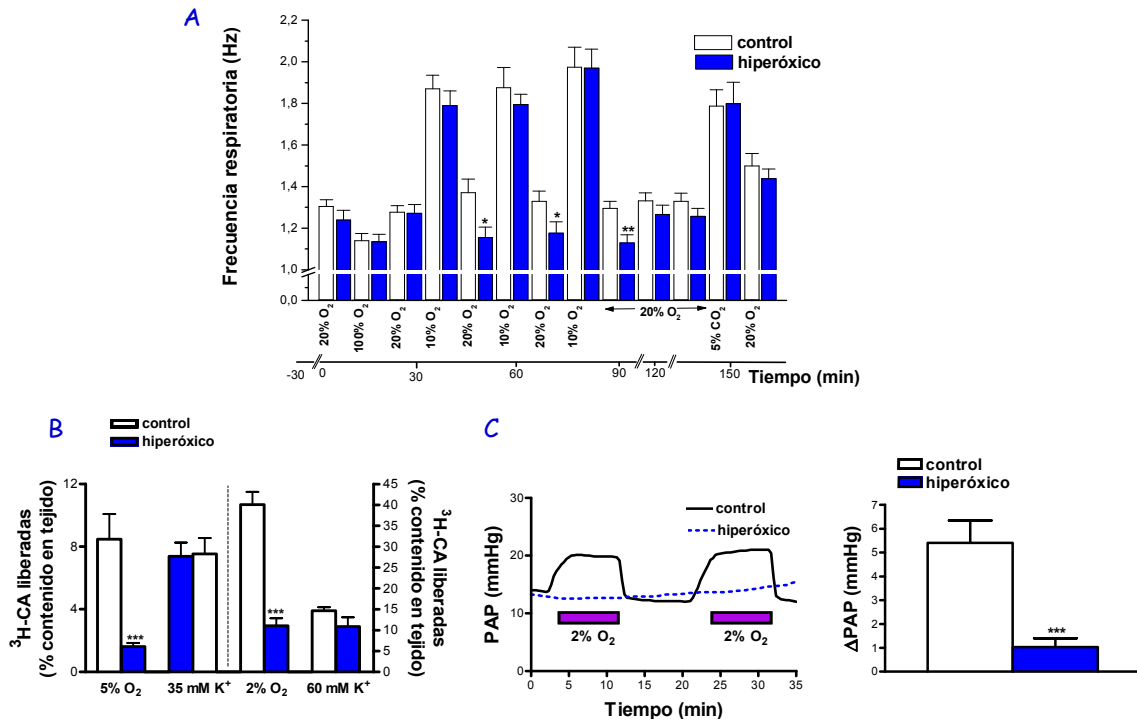


Figura R1. Respuestas del CC y de la circulación pulmonar a la hipoxia aguda en animales hiperóxicos vs controles: **A)** Modificación de la frecuencia respiratoria inducida por hipoxia, sucesivas hipoxias e hipercapnia (ratas de ambos sexos al 50%). **B)** Liberación de ³H-CA evocadas por hipoxia y alto K⁺ **C)** Efectos de la hipoxia (2% O₂, 8 minutos) sobre la PAP. (Tomado de Prieto Lloret, 2005, Tesis Doctoral).

Los datos de pletismografía (**Figura R1A**) muestran que la hipoxia perinatal no altera la frecuencia respiratoria en respuesta a la hipoxia aguda ni a la hipercapnia. Las únicas diferencias observadas se refieren a las frecuencias en los periodos posthipóxicos, donde apareció una leve depresión ventilatoria basal en los animales experimentales con respecto a los controles. Aunque en la Tesis de Prieto-Lloret sólo se pudo medir la frecuencia ventilatoria, la inferencia fue que la hipoxia no alteraba la ventilación pulmonar. En la **Figura R2A** confirmamos los hallazgos de Prieto-Lloret, esto es que la hipoxia perinatal no altera la frecuencia ventilatoria en ninguna de las atmósferas estudiadas; además observamos que

tampoco altera los volúmenes corrientes (**Figura R2B**) ni la ventilación pulmonar total por minuto (**Figura R2C**). Por tanto, los hallazgos pletismográficos, además de confirmar la conclusión de Prieto Lloret, demuestran la validez de nuestros protocolos experimentales.

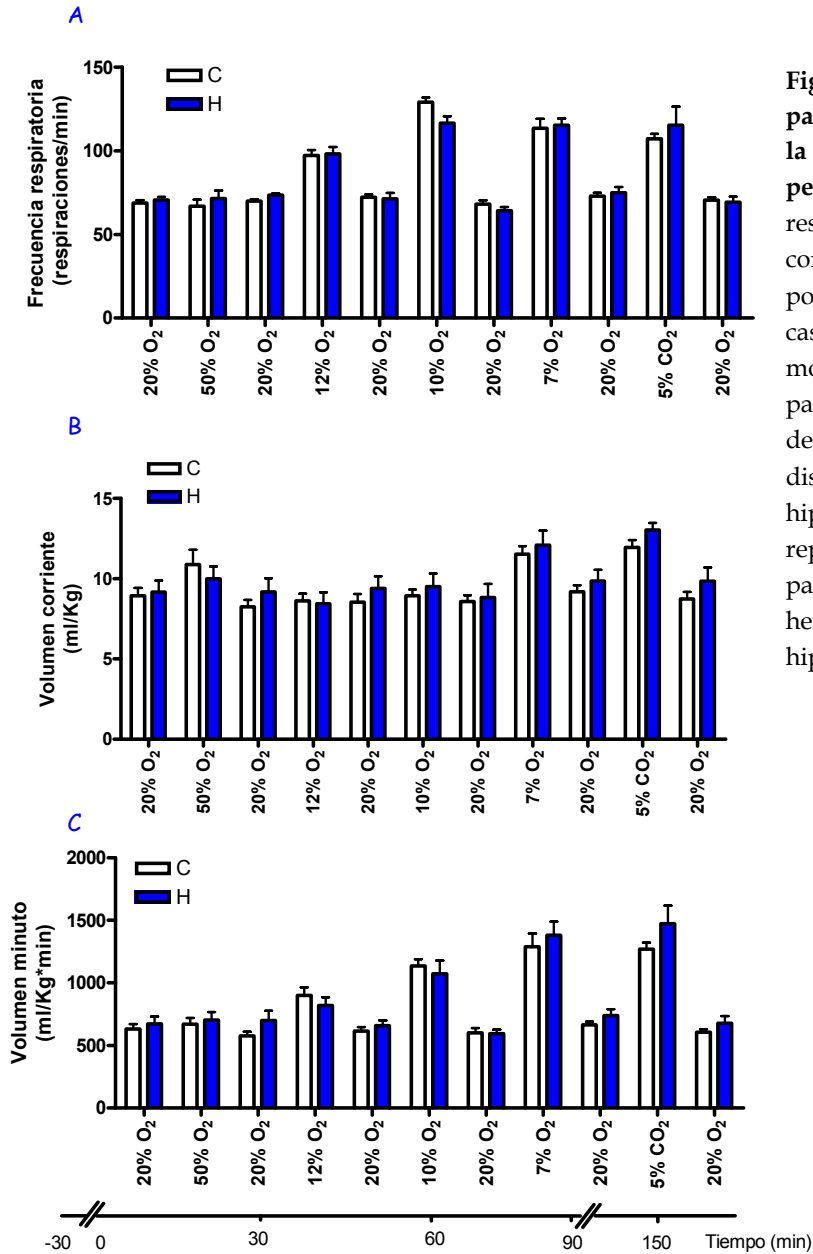


Figura R2. Análisis de los parámetros ventilatorios tras la exposición a hiperoxia perinatal. A) Frecuencia respiratoria B) Volumen corriente C) Flujo ventilatorio por minuto; en todos los casos se ha estudiado la modificación de estos parámetros tras la aplicación de hiperoxia, hipoxias de distinta intensidad e hipercapnia. Los datos representan media \pm SEM para n=8 machos y n=8 hembras controles (C) e hiperóxicos (H).

El apartado B de la **Figura R1** tomada de Prieto Lloret muestra que la liberación de ³H-CA en respuesta a hipoxia está fuertemente disminuida en los animales hiperóxicos, mientras que la liberación inducida por alto potasio no está alterada. Los resultados obtenidos en nuestro trabajo fueron esencialmente superponibles (**Figura R3**).

El apartado C de la **Figura R1** muestra el efecto de la hipoxia aguda sobre la presión pulmonar registrada en una preparación de pulmón aislado *in situ*, utilizada por Prieto Lloret en su Tesis Doctoral. Los datos evidencian que la hiperoxia perinatal produce una pérdida permanente y casi total (81%) de la VPH.

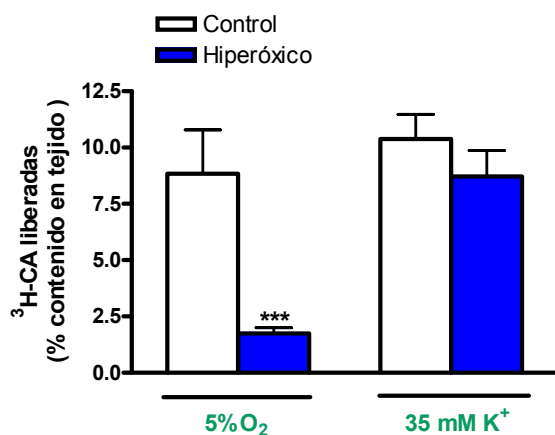


Figura R3. Liberación de ³H-CA evocadas por hipoxia (5% O₂) y alto K⁺ (35 mM K⁺) en CC obtenidos de animales controles e hiperóxicos. Los datos son medias ± SEM (n=12). ***p<0.001.

Nuestros experimentos en animal anestesiado intacto se presentan en la **Figura R4**. La presión arterial media en la arteria pulmonar (PAP) mientras los animales controles respiraban aire fue de 11.4 ± 0.9 mmHg y aumentó a 14.5 ± 1.3 (n=12; p<0.001, two tails paired t-test) al final del periodo en que los animales estaban sometidos a situación de hipoxia haciéndoles respirar 10% de O₂. Al volver a respirar aire, la PAP recuperó sus valores iniciales (11.4 ± 0.9). Los animales hiperóxicos tuvieron una PAP en normoxia de 12.3 ± 1.2 mmHg y ascendió a 13.1 ± 1.4 (n=14; p<0.05, two tails paired-t-test) mientras respiraban 10% de O₂ para retornar a valores normales al respirar aire de nuevo (12.8 ± 1.4). El Δ PAP inducido por la hipoxia ($[\text{PAP prehipóxica} + \text{PAP posthipóxica}/2] - \text{PAP hipóxica}$) en los animales controles fue de 3.1 ± 0.6 mmHg, mientras que en los animales hiperóxicos fue de 0.5 ± 0.3 mmHg (p<0.001; two tails unpaired t-test) representando una disminución de la respuesta hipóxica del 86%.

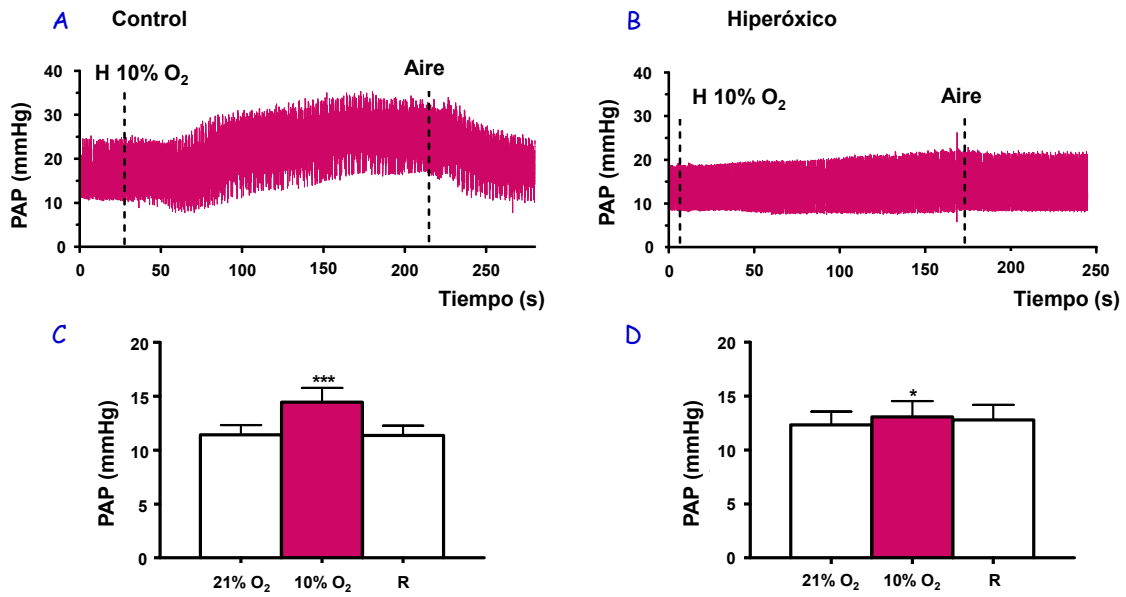


Figura R4. Vasoconstricción pulmonar hipóxica (10% O₂, 3 minutos) registrada en animales controles y perinatalmente hiperóxicos. A y B muestran registros típicos obtenidos, respectivamente, en animales controles e hiperóxicos. Están señalados con líneas verticales discontinuas los tiempos en los que se aplica la hipoxia y el aire. Las partes inferiores presentan las medias \pm SEM de las PAP medias en animales controles (C; n=12) e hiperóxicos (D; n=14) (R=recuperación). *p<0.05 y ***p<0.001 vs 21% O₂ (two tails paired t-test).

Dado que la hipoxia produce vasodilatación e hipotensión sistémicas, la VPH registrada en animal intacto se ve atenuada (Ver Discusión), habíamos de definir si las diferencias en VPH encontradas entre los animales controles e hiperóxicos perinatales podían ser atribuibles a efectos sistémicos. Para ello medimos la PA sistémica simultáneamente a la VPH en un número representativo de animales. Los datos que se muestran en la **Tabla RI** verifican el efecto hipotensor sistémico de la hipoxia y excluyen que una hipotensión sistémica exagerada sea la responsable de la casi total pérdida de la VPH.

Tabla RI. PA media en animales controles e hiperóxicos respirando aire y 10% de O₂

Grupo experimental	Control	Hiperóxico
PA Sistémica en Aire	126,7 \pm 6,3 (n=6)	121,4 \pm 6,6 (n=11)
PA sistémica en 10% O ₂	81,2 \pm 5,7 (n=6)***	94,5 \pm 7,2 (n=11)***
Δ PA aire - PA 10% O ₂	45,5 \pm 8,1 (n=6)	26,9 \pm 2,9 (n=11)+

Valores medidos en mmHg. ***p<0.001 vs. PA sistémica respirando aire. +p<0.5 vs. Δ PA en controles. Análisis estadístico realizado mediante t test de Student (*paired t-test; +unpaired t-test).

En su conjunto, pues, los registros de la VPH y de la PA sistémica ratifican el efecto obtenido en la preparación aislada *in situ* e indican que la exposición perinatal a una atmósfera hiperóxica produce la pérdida de la capacidad de las AP para responder a la hipoxia. Finalmente queremos señalar que los datos obtenidos en nuestro estudio indican que el modelo experimental es reproducible, al menos en lo que hace referencia a la funcionalidad del CC y de los vasos pulmonares.

2. EFECTOS DE LA HIPEROXIA PERINATAL SOBRE ALGUNOS PARÁMETROS RELACIONADOS CON EL ESTADO REDOX EN TEJIDOS

Es un hecho bien conocido que la hiperoxia produce un aumento en la génesis de especies reactivas de O₂ (ROS, *Reactive Oxygen Species*) produciendo daño en múltiples tejidos y de forma muy particular en tejido pulmonar (ver Pagano y Barazzone-Argiroffo, 2003; Halliwell y Gutteridge, 2007). Además, se sabe también que puede proporcionarse protección frente a las ROS con un gran abanico de moléculas antioxidantes, incluyendo la sobre-expresión de GR, el enzima que usando equivalentes de reducción del NADPH del ciclo de las pentosas reduce el GSSG a GSH y que por tanto tiende a mantener el potencial redox del par glutatión (E_{GSH}) elevado (O'Donovan y Fernandes, 2000; González et al., 2004 a, b). Por tanto, y a pesar de que Bavis et al. (2008) habían encontrado que la hiperoxia no aumentaba los niveles plasmáticos de proteínas carboniladas (un índice de daño oxidativo) de los animales hiperóxicos de 2 y 8 días de edad, y de que la suplementación materna con vitamina E o la inyección intraperitoneal de MnTMPyP (un mimético artificial de la SOD) a los animales recién nacidos no prevenía los efectos deletéreos de la hiperoxia sobre el CC en el animal adulto, (atrofia y atenuación de las respuestas a la hipoxia; ver introducción), decidimos reinvestigar si el daño oxidativo era o no responsable de los propios daños del CC y de la pérdida de la VPH.

La **Figura R5** muestra los niveles de GSH, GSSG y el E_{GSH} obtenidos en pulmón, hígado y cerebro de ratas controles e hiperóxicas de 7 y 90 días de edad (esto es al momento de realizar los experimentos). Los niveles de GSH en pulmón de los animales controles de 7 días son de $1,06 \pm 0,07 \mu\text{mol/g}$, estando

significativamente disminuidos en los animales hiperóxicos de la misma edad ($0,70 \pm 0,04 \mu\text{mol/g}$; $p < 0,05$). A los 90 días los niveles absolutos y grado de disminución de los niveles de GSH son comparables. Los niveles de GSSG en los animales controles de 7 días son de $0,09 \pm 0,02 \mu\text{mol/g}$ tejido, estando muy aumentados en el grupo hiperóxico ($0,18 \pm 0,02 \mu\text{mol/g}$ tejido; $p < 0,01$) y a los 90 días, los niveles en controles ($0,18 \pm 0,01 \mu\text{mol/g}$ tejido) y en hiperóxicos ($0,16 \pm 0,02 \mu\text{mol/g}$ tejido) son similares. Ello determina que el E_{GSH} a los 7 días sea de $-192,91 \pm 2,69 \text{ mV}$ en los controles y de $-170,68 \pm 2,93 \text{ mV}$ en los hiperóxicos ($***p < 0,001$), mientras que a los 90 días son esencialmente idénticos en ambos grupos, $-178,79 \pm 2,23 \text{ mV}$ controles *vs* $-174,87 \pm 2,21 \text{ mV}$ en hiperóxicos (**Figura R5A**, panel superior).

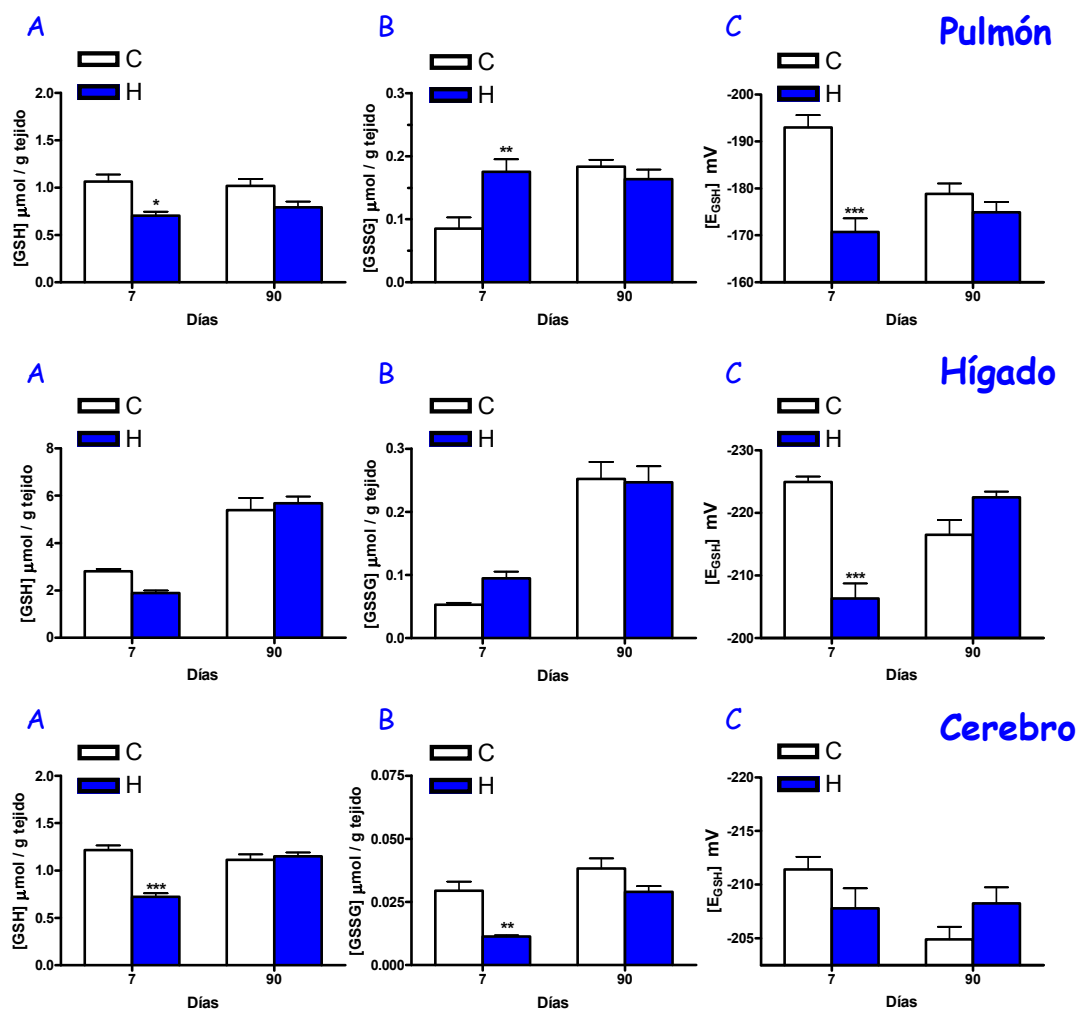
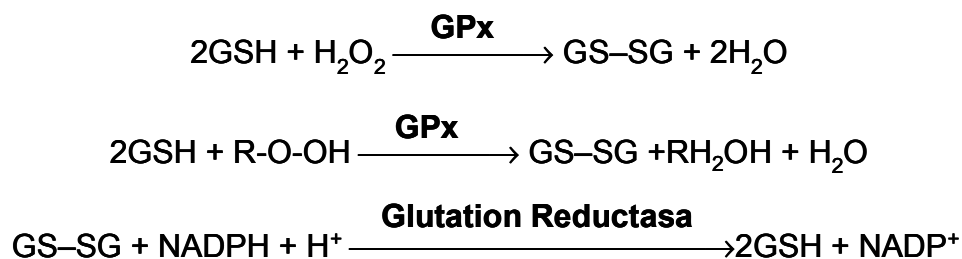


Figura R5. Niveles de GSH (A) y GSSG (B) y potencial redox (C). En pulmón (panel superior), hígado (panel central) y cerebro (panel inferior). Los datos son medias \pm SEM de 7 valores individuales. Análisis estadístico realizado mediante two way anova (Bonferroni post test). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Aunque con valores absolutos más altos, ya que el hígado es el tejido más rico en glutatión y con el potencial redox más alto del organismo (Halliwell y Gutteridge, 2007), su comportamiento en animales controles e hiperóxicos es comparable al observado en pulmón, esto es, hay una disminución del E_{GSH} en los animales hiperóxicos respecto a los controles a los 7 días (***) $p < 0.001$ y una normalización a los 90 días (**Figura R5A**, panel medio).

Finalmente, el cerebro sigue un comportamiento distinto. Posee valores totales de glutatión comparables a los de pulmón aunque los niveles de GSSG son más bajos lo que determina que tenga un E_{GSH} mayor que el pulmón. A los 7 días hay una disminución de los dos elementos del par redox en los animales hiperóxicos con el resultado neto de que el E_{GSH} , aunque ligeramente inferior, no es estadísticamente diferente al de los controles; no obstante la disminución de la concentración total de glutatión indica que la capacidad de defensa frente al estrés oxidativo está marcadamente disminuida (Schafer y Buettner, 2001). A los 90 días no hay diferencias significativas en ninguno de los parámetros entre ambos grupos. Como conclusión provisional podríamos decir que la hiperoxia produce un estado oxidativo en animales recién nacidos, aunque parece existir una protección especial en tejido cerebral y dicho estado oxidativo se normaliza con la edad de tal forma que al momento de realizar los experimentos funcionales (3-3,5 meses de edad) el estado redox es normal en los tres tejidos.

La GPx comparte su sustrato, el H_2O_2 , con la catalasa pero se diferencia de ella en que la GPx necesita para llevar a cabo su reacción un sustrato, el GSH (Halliwell y Gutteridge, 2007). Además la GPx también puede reaccionar de manera efectiva con otros hidroperóxidos orgánicos en general, por lo que protege frente a este tipo de ROS. La reacción de la GPx y la recuperación del GSH por la GR son como sigue:



Pero lo más importante en el presente contexto es que la expresión de la GPx es potencialmente regulable por los niveles de ROS, pudiendo aumentar su expresión, al menos en algunos tejidos, y no siempre guardando relación con la intensidad del estrés oxidativo (ver Halliwell y Gutteridge, 2007; Quintero et al., 2013). Por ello, en los mismos tejidos de los animales en los que habíamos medido el estado redox, medimos la actividad total de GPx cuyos datos se muestran en la **Figura R6**. El primer hecho que nos muestra la figura es que la actividad del enzima es edad dependiente, siendo mucho menor en los tejidos de los animales de 7 días que en los animales adultos de 90 días. Un segundo hecho es que los niveles de actividad de GPx total son muy distintos de unos tejidos a otros: $15,37 \pm 1,33$ UI/g en pulmón, $234,20 \pm 14,82$ UI/g tejido en hígado y $2,51 \pm 0,21$ UI/g tejido en cerebro en los animales controles adultos, encontrándose diferencias comparables en los animales de 7 días. Finalmente, el tercer hecho relevante es que no existen diferencias de actividad GPx en ninguno de los tejidos ni a 7 ni a 90 días; esto es, la exposición perinatal a la hiperoxia no modificó de forma significativa los niveles de actividad de la GPx en ninguno de los tres tejidos.

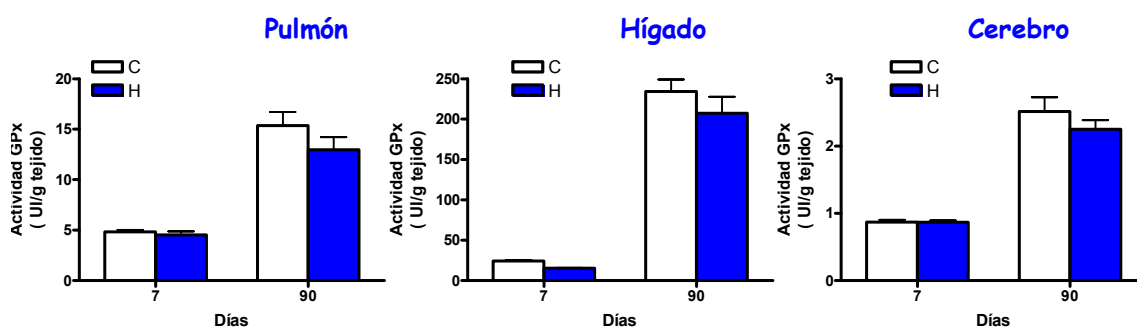


Figura R6. Actividad de la enzima GPx en pulmón, hígado y cerebro de animales controles e hiperóxicos de 7 y 90 días de edad. Los datos se expresan como UI/g tejido y representan valores medios \pm SEM de 5 a 7 valores individuales.

3. HIPEROXIA PERINATAL Y ESTADO REDOX EN TEJIDOS: EFECTOS DE UNA DIETA SUPLEMENTADA CON ANTIOXIDANTES

Los hallazgos presentados en el apartado anterior indican que en los animales de 7 días de edad hay un estado de estrés oxidativo apreciable en pulmón e hígado y una disminución de la capacidad de defensa frente al estrés oxidativo en cerebro, aunque en este órgano se mantiene el E_{GSH} , principal responsable del

estado redox celular (Schafer y Buettner, 2001). Por ello, decidimos realizar un nuevo grupo de experimentos en los que las madres durante todo el periodo de exposición a hiperoxia y las crías hasta el periodo del destete, que coincidía con la finalización de la exposición a la atmósfera rica en O₂ (28 días de edad), fueron alimentadas con una dieta suplementada con vitamina E y ácido lipoico (AL) (vitamina E, 400 mg/Kg de comida y AL racémico, 1 g/Kg de comida).

La dosis de vitamina E utilizada como suplemento es habitual en la rata (Martin et al., 1999; Hsu et al., 1998), siendo lo mismo cierto en el caso del AL (Hagen et al., 2002; Suh et al., 2001, 2005; Moini et al., 2002). La razón fundamental para elegir estos agentes antioxidantes es que ambos compuestos son naturales y existen sistemas enzimáticos que reciclan las formas reducidas y oxidadas y que interrelacionan tanto a la vitamina E como al AL con el glutatión, la vitamina C y otros sistemas antioxidantes (ver esquema en la **Figura R7**; Sen, 1998; Moini et al., 2002; Rochette et al., 2013).

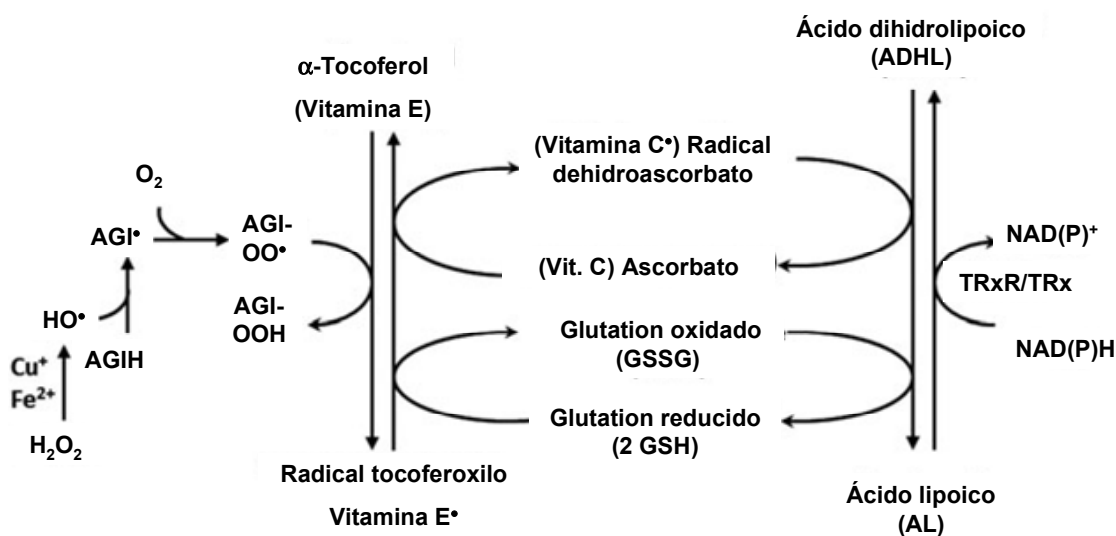


Figura R7. Interrelaciones más relevantes entre los antioxidantes: GSH, AL y ácido dihidrolipoico (ADHL). El AL/ADHL aumentan la eficiencia del ciclo de la vitamina C y activan el ciclo de la vitamina E, responsable directa de la reducción de radicales peroxilos de los AGI (ácidos grasos poliinsaturados) de las membranas celulares a hidroperóxidos. (TRxR/TRx) tioredoxina y tioredoxina reductasa.

Según muestra la **Figura R8**, los niveles de glutatión encontrados en los animales suplementados nos indican que la suplementación fue efectiva para corregir la disminución del E_{GSH} en pulmón e hígado a los 7 días sin modificar sustancialmente los niveles totales de glutatión, sino a expensas de disminuir los

niveles de GSSG; en hígado a los 90 días, a pesar de haber interrumpido la suplementación a los 28 días postnatales, hay un aumento moderado pero significativo de los niveles de GSH que se traduce en un aumento del E_{GSH} .

En cerebro, por el contrario, la suplementación produjo un cambio oxidativo permanente tanto a los 7 como a los 90 días, debiéndose en ambos casos a la caída del E_{GSH} a un aumento del GSSG respecto al grupo hiperóxico. Por tanto, una vez más, observamos que en comparación con el pulmón y el hígado, el cerebro posee un comportamiento específico.

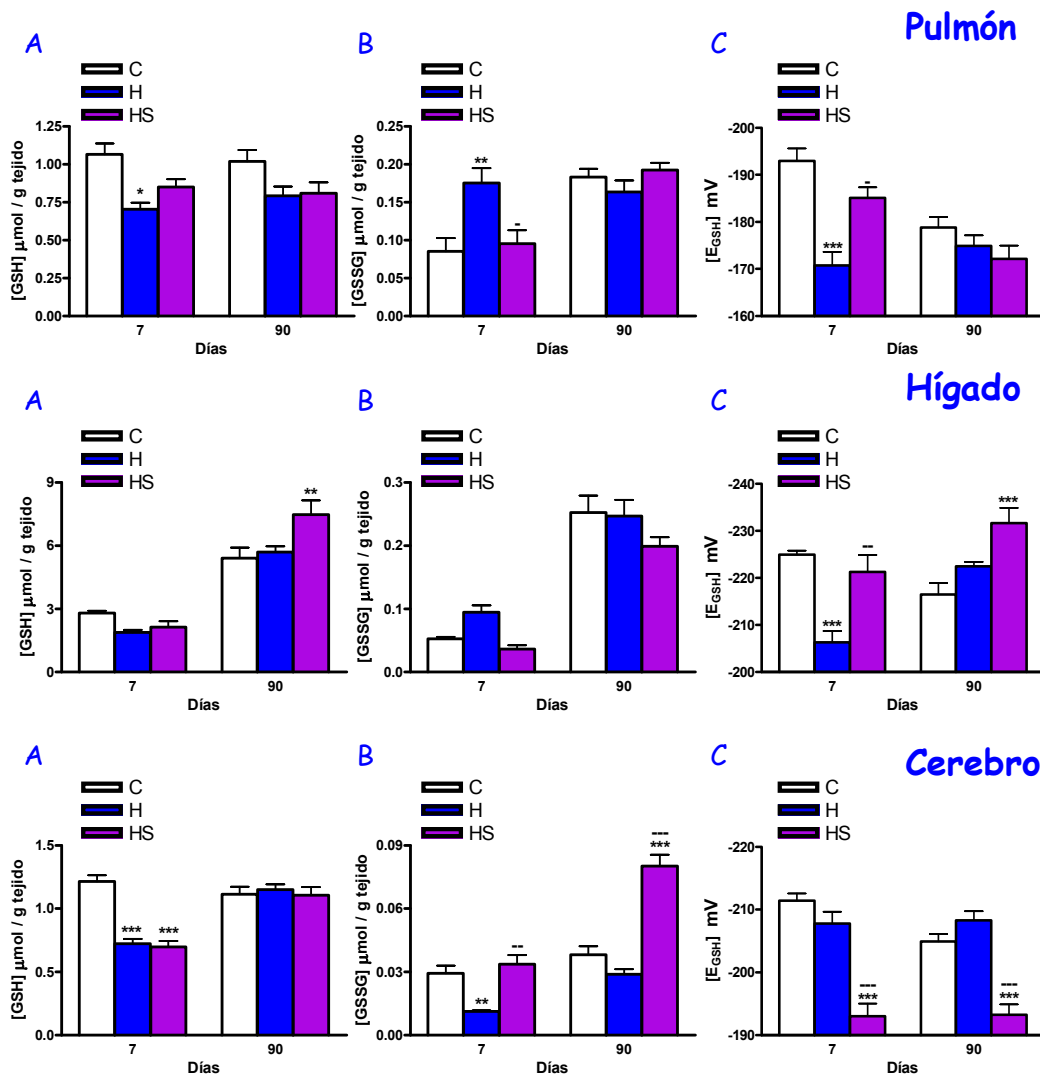


Figura R8. Niveles de GSH (A) y GSSG (B) y potencial redox (C). Valores obtenidos en pulmón (panel superior), hígado (panel central) y cerebro (panel inferior) de animales controles, hiperóxicos e hiperóxicos suplementados. Los datos son medias \pm SEM de 8 valores individuales para los animales suplementados y de 12-16 para controles e hiperóxicos. Análisis estadístico realizado mediante two way anova (Bonferroni post test). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

En el contexto de este trabajo, y con la colaboración del Dr. O. Montero, responsable del equipo de espectrometría de masas del IBGM, pusimos a punto un método para medir en plasma niveles de tocoferoles, AL y Trolox, un análogo sintético de la vitamina E que es hidrosoluble (Montero et al., 2012). El método es el único hasta el presente capaz de separar y medir con una inyección única de la misma muestra AL y/o Trolox junto con α -tocoferol, δ -tocoferol y γ -tocoferol. Sin embargo, no posee sensibilidad para medir AL en muestras de sangre ni de humanos ni de rata; de hecho niveles plasmáticos de AL en sangre sólo se han podido medir tras una suplementación masiva y aguda del mismo (Trivedi et al., 2004; Chen et al., 2005). La **Figura R9** muestra los niveles de α -tocoferol.

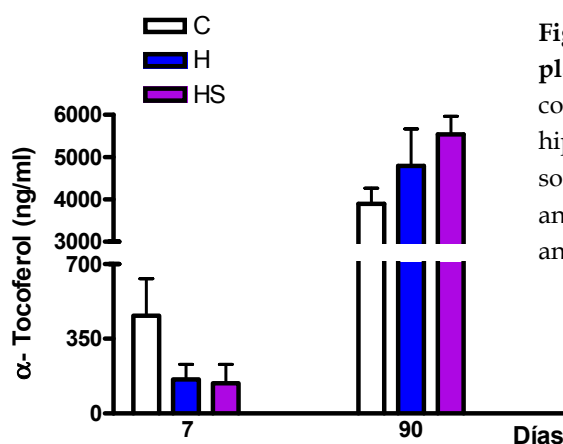


Figura R9. Niveles de α -Tocoferol en plasma de rata de 7 y 90 días. C, controles; H, hiperóxicos; HS, hiperóxicos suplementados. Los datos son medias \pm SEM de 3-6 datos para los animales de 7 días y de 8-16 para los animales de 90 días.

A pesar de la dispersión de los datos de 7 días, dado el reducido número de muestras analizadas por la dificultad para obtener sangre suficiente de estos animales, es evidente que los niveles de α -tocoferol aumentan por un factor >10 al madurar los animales. También parece evidente que la hiperoxia no modificó los niveles de α -tocoferol a ninguna de las dos edades y que la suplementación materna con vitamina E y AL no aumentó los niveles de α -tocoferol en las crías. Mientras que en humanos nuestro método sí que tiene sensibilidad para medir los otros tocoferoles, que son minoritarios y que en conjunto representan $<20\%$ del total, en la rata no pudimos detectarlos, probablemente porque en esta especie sean aún más minoritarios.

4. HIPEROXIA PERINATAL: EFECTOS DE UNA DIETA SUPLEMENTADA CON ANTIOXIDANTES SOBRE LA RESPUESTA A LA HIPOXIA AGUDA DEL CC Y DE LA CIRCULACIÓN PULMONAR

Dados los efectos favorables de la suplementación de la dieta con antioxidantes sobre el E_{GSH} en pulmón e hígado consideramos de gran interés definir si este tratamiento corregía las alteraciones funcionales producidas por la hiperoxia en la circulación pulmonar, VPH, y en el CC. Siguiendo la misma sistemática que con los animales hiperóxicos, en los hiperóxicos suplementados comenzamos por medir las respuestas ventilatorias, ya que como es conocido, el CC media toda la respuesta ventilatoria a la hipoxia.

Como puede observarse en la **Tabla RII**, la suplementación no modificó de forma significativa los parámetros ventilatorios obtenidos en los animales hiperóxicos, que a su vez tampoco son diferentes de los obtenidos en los animales controles, excepción hecha de una moderada disminución de la frecuencia y también del volumen minuto con la hipoxia más moderada del 12% de O₂.

Tabla RII. Parámetros ventilatorios en controles, hiperóxicos e hiperóxicos suplementados

Atmósfera	20% O ₂ (aire)	12% O ₂	10% O ₂	7% O ₂	5% CO ₂ en aire
A. Animales Control					
Frecuencia	69 ± 2	97 ± 3**	129 ± 3***	114 ± 6***	107 ± 3***
Vol. Tidal	9 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	11 ± 0**	12 ± 0**
Vol. minuto	630 ± 41	900 ± 65*	1135 ± 55***	1289 ± 107***	1269 ± 53***
B. Animales Hiperóxicos					
Frecuencia	70 ± 2	98 ± 4***	117 ± 4***	115 ± 4,1***	115 ± 11***
Vol. Tidal	9 ± 1	8 ± 1	9 ± 1	12 ± 1**	13 ± 0***
Vol. minuto	672 ± 59	818 ± 65	1073 ± 106***	1381 ± 109***	1474 ± 143***
C. Animales Hiperóxicos Suplementados					
Frecuencia	72 ± 2	82 ± 2+α	114 ± 5***	118 ± 7***	102 ± 5***
Vol. Tidal	8 ± 0	8 ± 0	9 ± 1	11 ± 1***	11 ± 1***
Vol. minuto	584 ± 20	645 ± 28+	970 ± 77***	1327 ± 88***	1218 ± 68***

Valores medidos como: frecuencia, respiraciones/min; VT en ml/Kg; Volumen/min, ml/Kg*min. Los datos son medias ± SEM de 7-12 animales. Las diferencias con respecto a las condiciones normóxicas controles fueron analizadas utilizando análisis de varianza de dos vías (two way anova) para medidas repetidas (Bonferroni post test) *p<0.05, **p<0.01, y ***p<0.001 vs 20%O₂. Las diferencias entre C, H e HS fueron analizadas de dos formas, utilizando paired t test de 2 colas +p<0.05 vs controles e hiperóxicos y two way anova para medidas no repetidas con post test de Bonferroni a p<0.05 vs hiperóxicos.

La **Figura R10A** muestra los resultados obtenidos en la liberación de CA por el CC en respuesta a un estímulo hipóxico y a un estímulo despolarizante inespecífico. Una vez más observamos que la hiperoxia lesiona de forma específica la respuesta a la hipoxia sin afectar la respuesta inespecífica, lo que indicaría que la hiperoxia daña la cascada de transducción en una etapa previa a la despolarización (ver Prieto-Lloret et al., 2004). Estos resultados, unidos a los mostrados en la **Tabla RII**, indicarían que la suplementación no ha revertido la funcionalidad del CC y que, como es el caso en los animales hiperóxicos, la ventilación en normoxia y las respuestas a la hipoxia se mantienen merced a la redundancia de la información que desde el CC llega al tronco del encéfalo.

Puesto que los estudios previos de nuestro grupo (Pérez García et al., 1990, 1991) sugieren que el AMPc juega un papel importante en la modulación del proceso de quimiorrecepción, decidimos estudiar su acumulación en el CC de estas ratas sometidas a hiperoxia perinatal (H) en ausencia o presencia de la dieta suplementada con antioxidantes (HS).

Como puede verse en las **Figuras R10B** y **R10C**, el grupo control sufre un aumento por un factor aproximado de 3 en los niveles de AMPc al aplicar el estímulo hipóxico del 7% O₂, tanto en valores absolutos (1123 ± 211 vs 374 ± 82 fmol/CC) como en valores normalizados por el peso ($18,1 \pm 3,3$ vs $7,0 \pm 1,6$ pmol/mg tejido) y que dicho aumento se pierde para el grupo hiperóxico, sin que la suplementación aplicada sea capaz de revertir este déficit. Con lo que podemos concluir que la exposición hiperóxica perinatal provoca una pérdida de la capacidad de estimulación hipóxica de incrementar los niveles de AMPc en el CC, dejando los valores para ambos grupos experimentales en una situación similar a las condiciones basales (95% O₂).

En un nuevo grupo de experimentos estudiamos el comportamiento de la circulación pulmonar, de la VPH, en los animales hiperóxicos con dieta suplementada con antioxidantes.

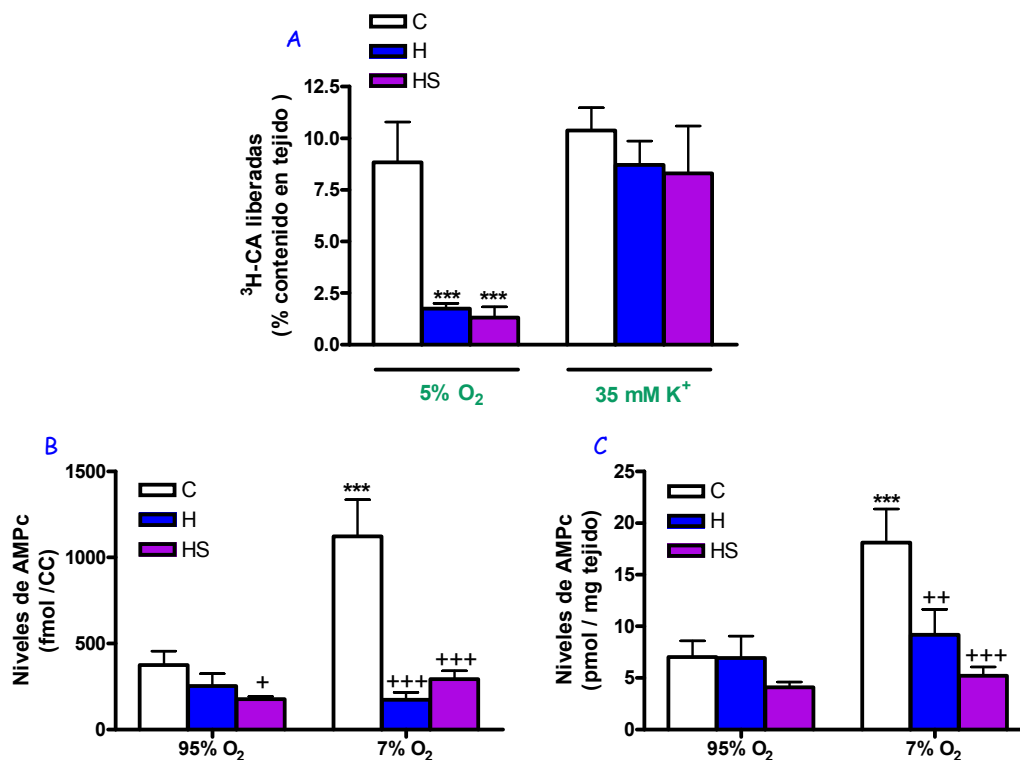


Figura R10. Efectos de la hiperoxia sobre la liberación de CA y sobre los niveles de AMPc en el CC de ratas C, H, e HS. **A)** Liberación de ³H-CA evocada por un estímulo hipóxico (5% O₂) frente a un estímulo despolarizante moderado (35 mM K⁺). Los estímulos se aplicaron por incubación de los CC durante 10 minutos en soluciones equilibradas. Los datos son medias ± SEM (n=13-15). ***p<0.001. **B y C)** Efecto de la hipoxia (7% O₂) sobre los niveles de AMPc en CC de ratas C, H e HS. En B se representan los datos como valores absolutos en fmol/CC y en C de un modo normalizado frente al peso como pmol/mg tejido. El análisis estadístico se ha realizado utilizando one way anova (Newman Keuls post test). Los datos representan media ± SEM para n=16 hembras C, H e HS para cada grupo. ***p<0,001 vs 95% O₂; +p<0.05, ++p<0,01, +++p<0,001 vs Control.

La **Tabla RIIB** muestra que la suplementación con dieta antioxidante revirtió la VPH de tal forma que el aumento de PAP provocado por la hipoxia (3 minutos respirando 10% O₂) fue esencialmente idéntico al encontrado en animales controles (controles, 3.1 ± 0.6; hiperóxicos suplementados, 3.0 ± 0.3; p>0.05) siendo el aumento de la PAP en hiperóxicos estadísticamente menor que en controles e hiperóxicos suplementados (+++p<0.001 hiperóxicos vs. controles e hiperóxicos suplementados). Para descartar que la respuesta en los animales hiperóxicos suplementados fuera debida a posibles efectos o influencias secundarias ejercidos desde la circulación sistémica, medimos también la PA sistémica (**Tabla RIIB**) observando que dicha presión era normal y que la hipotensión generada por la hipoxia aguda era comparable a la observada en los animales controles; como ya habíamos visto en un apartado previo en los animales hiperóxicos este efecto

hipotensor sistémico de la hipoxia aguda es menor que en los controles y vemos ahora que también es menor que en los hiperóxicos suplementados.

Tabla RIII. Efecto de un episodio de hipoxia aguda sobre la presión arterial pulmonar media (A) y sistémica media (B) en animales controles, hiperóxicos e hiperóxicos suplementados.

A. Presión Arterial Pulmonar Media (PAP)				
Condición	Grupo Experimental	Control (n= 12)	Hiperóxico (n= 14)	H. Suplementado (n=13)
Aire		11.4 ± 0.9	12.3 ± 1.2	10.6 ± 1.0
10% O ₂		14.5 ± 1.3***	13.1 ± 1.4*	13.8 ± 1.1***
Recovery		11.4 ± 0.9	12.8 ± 1.4	11.0 ± 1.0
Delta [(aire + R/2)] - 10% O ₂		3.07 ± 0.59	0.52 ± 0.27***	3.00 ± 0.26
B. Presión Arterial Sistémica Media (PAS)				
PA Sistémica en Aire		126,7 ± 6,3	121,4 ± 6,6	124,2 ± 9,7
PA sistémica en 10% O ₂		81,2 ± 5.7**	94,5 ± 7.2***	74,2 ± 6,0***
Δ PA aire - PA 10% O ₂		45,5 ± 8,1	26,8 ± 2,9+	49.9 ± 6.2

Valores medidos en mmHg. Los datos son medias ± SEM de 12 a 14 datos. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001 hipoxia (10% O₂) vs. aire (paired-student-t-test); +p<0.05; ***p<0.001 hiperóxico vs. controles e hiperóxicos suplementados (one way anova).

5. PROPIEDADES ELECTROFISIOLÓGICAS DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS AISLADAS DE ARTERIA PULMONAR DE ANIMALES CONTROLES E HIPERÓXICOS PERINATALES

El hallazgo de que la hiperoxia abolía la VPH y de que la suplementación con dieta antioxidante la revertía nos llevó a establecer una colaboración con el Prof. Pérez-Vizcaíno de la Complutense de Madrid, que es un experto reconocido en el estudio de los mecanismos de regulación de la VPH y de la fisiopatología de la hipertensión. Para llevar a cabo estos experimentos realizamos las exposiciones a hiperoxia en nuestro laboratorio y con los animales ya de ≈90 días viajamos a Madrid donde se realizaron los experimentos siguiendo protocolos habituales en aquel laboratorio en células disociadas y cultivadas <12 h (Cogolludo et al., 2003; Frazziano et al., 2011).

La **Figura R11** muestra el potencial de membrana (E_m), la capacitancia (C_m) y las relaciones densidad de corriente de K^+ / E_m en el rango de potenciales de membrana de -60mV a $+60\text{mV}$.

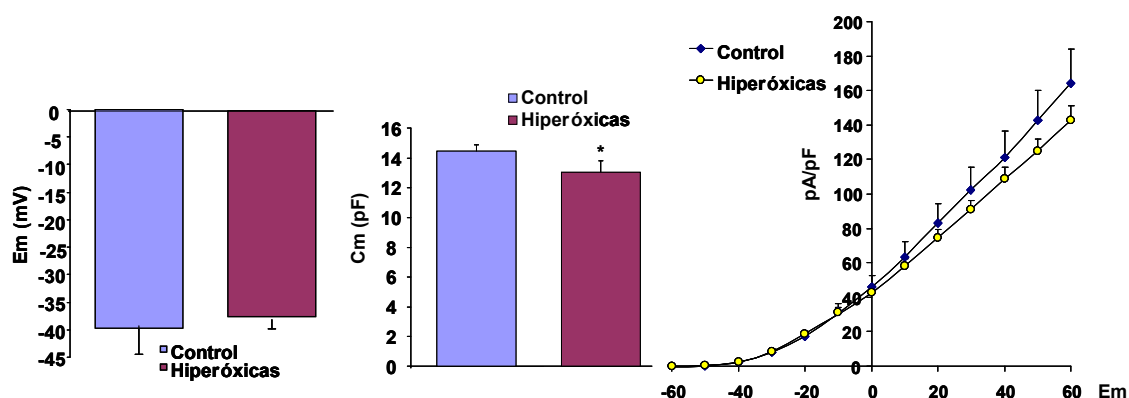


Figura R11. E_m , C_m y relación densidad de corriente de K^+ - E_m . Estos parámetros han sido obtenidos en células aisladas de segmentos de resistencia de AP (arterias de $<400\mu\text{m}$ de diámetro) de animales controles e hiperóxicos perinatales. Los datos son medias \pm SEM de 6-8 valores individuales obtenidos en el mismo número de células.

Se observa que todos los parámetros de las células en ambos grupos de animales son comparables. El E_m en controles fue -37 ± 3 mV y en hiperóxicos de -35 ± 1 mV ($p > 0.05$). La C_m de la membrana fue de 14.4 ± 0.2 pF en controles y de 13.1 ± 0.3 pF en hiperóxicos ($p < 0.05$), sugiriendo que las células de estos animales son ligeramente más pequeñas o ligeramente más "leaky". Finalmente las relaciones densidad de corriente de K^+ / E_m son superponibles en lo que podemos considerar el rango fisiológico del E_m , de $-50/-40$ mV a $+20\text{mV}$.

Obviamente, y dado el estado de la literatura (ver Introducción), el aspecto más importante a determinar era si las corrientes de K^+ sensibles a la hipoxia que poseen las células musculares de la arteria pulmonar se mantenían o no en los animales hiperóxicos cuya respuesta de VPH estaba pérdida. Como puede verse en la **Figura R12** las corrientes de K^+ de las células de los animales hiperóxicos conservan un componente que es sensible a la hipoxia y que representa un porcentaje de las I_{K^+} totales comparable al que poseen las células de los animales controles a los tres tiempos de exposición hipóxica a los que se midió.

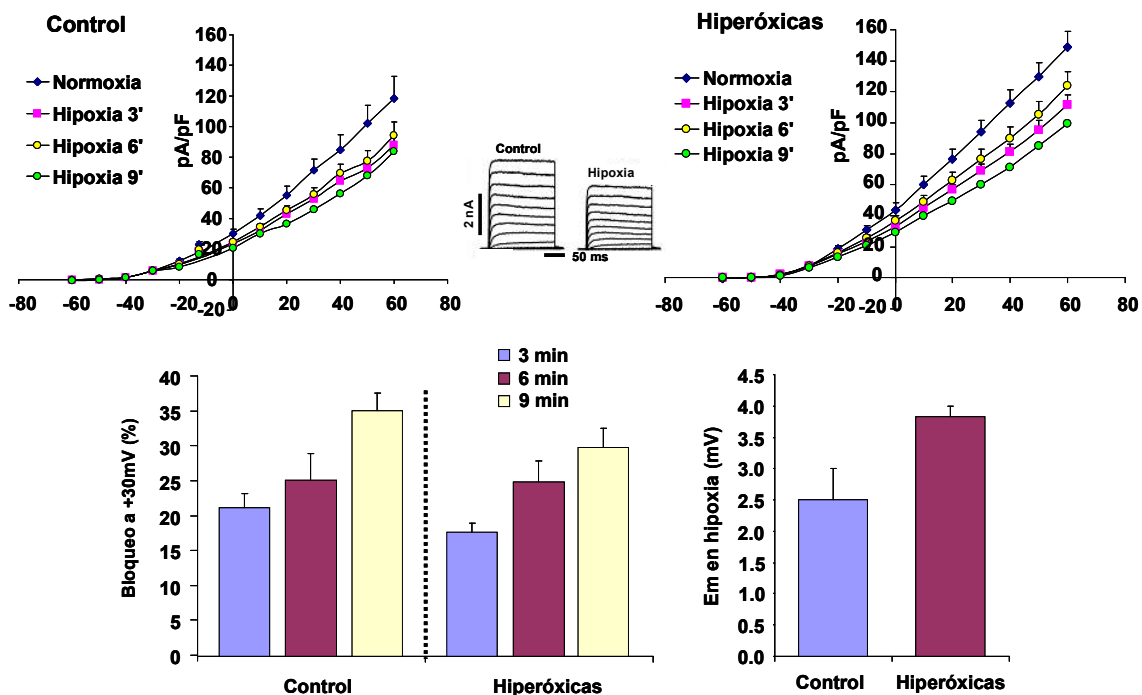


Figura R12. En la parte superior se muestran curvas I/V obtenidas en CMLAP de resistencia, a la izquierda de animales controles y a la derecha de animales hiperóxicos; en el centro registros tipo de corrientes de K⁺ obtenidos en normoxia e hipoxia a Em de -60 a +60 mV en una célula control. En la parte inferior, a la izquierda pueden verse las medias \pm SEM (n=3-6) de la inhibición de la corriente por hipoxia en células de animales controles e hiperóxicos; a la derecha despolarización media producida por la hipoxia en células controles e hiperóxicas (media \pm SEM de 3 datos individuales).

En primer lugar pensamos que carecía de sentido realizar experimentos electrofisiológicos en animales hiperóxicos suplementados, ya que si con la hiperoxia, aparentemente, no se alteraban las propiedades electrofisiológicas de las células no había nada que revertir con la suplementación. En segundo lugar, y con carácter más general, nos llevaron a preguntarnos si realmente los canales de K⁺ sensibles a la hipoxia son necesarios para la VPH o, mejor aún, nos permitirían afirmar que dichos canales de K⁺ (cualquiera que sea su identidad molecular; ver Introducción) si fueran necesarios no son suficientes para que exista una respuesta celular integrada como es la contracción. ¿Qué elemento de la cascada de transducción ha sido suprimido por la hiperoxia? (ver Discusión).

Dado que las ROS son consideradas elementos *trigger* o disparadores de la VPH (ver Introducción) medimos en tres preparaciones de arterias de resistencia desnudas de endotelio de animales controles y otras tres de animales hiperóxicos producción de O₂[•] con DHE (ver He et al., 2005; Frazziano et al., 2011).

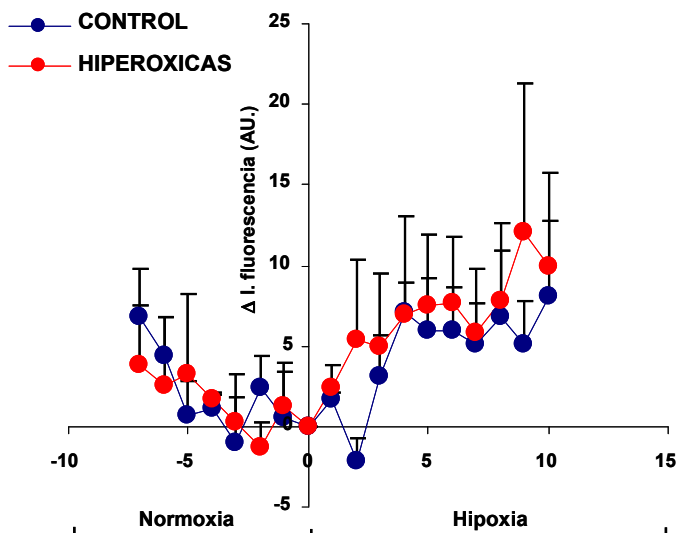


Figura R13. Señales de fluorescencia emitidas por tres segmentos de resistencia de arterias pulmonares controles e hiperóxicas previamente cargados con DHE, un indicador de anión superóxido (datos son medias \pm SEM de 3 datos individuales)

Según puede verse en la **Figura R13**, aun cuando las señales son dispersas, los datos sugieren que tampoco hay diferencias en la producción de ROS, por lo que habríamos de concluir como en el caso de las corrientes de K^+ : si la producción de ROS es condición necesaria para la VPH, no es condición suficiente.

Ante estos hallazgos y en función de las altas exigencias tanto de trabajo como económicas de estos experimentos, decidimos posponer este proyecto y dirigirnos a lo que constituye el bloque 2 de este trabajo de Tesis Doctoral.

6. ESTUDIO DE LOS MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA ADAPTATIVA DEL CC A LA HIPOXIA CRÓNICA

En esta segunda parte de mi Trabajo de Tesis Doctoral voy a presentar los resultados obtenidos en los experimentos realizados con animales expuestos a HC (10-11% O_2), como modelo para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta adaptativa del CC a la HC, bien por ascenso a grandes alturas o por ciertas patologías respiratorias como la EPOC. Nuestra hipótesis es que aquellos mecanismos que se encuentren alterados durante la adaptación a la HC pueden ser importantes también en la detección y respuesta a la hipoxia aguda.

6.1 PARÁMETROS VENTILATORIOS MEDIDOS POR PLETISMOGRAFÍA EN ANIMAL ENTERO

En primer lugar hemos comprobado si el patrón respiratorio de las ratas expuestas a HC correspondía al esperado, de acuerdo a los datos previos de nuestro laboratorio, es decir, si las ratas se habían aclimatado a la hipoxia mantenida. Para ello hemos medido los parámetros ventilatorios habituales mediante pletismografía de cuerpo entero, empleando 10 ratas controles y 10 ratas experimentales expuestas durante 7 días a una atmósfera de 10-11% O₂.

La **Figura R14** muestra los protocolos seguidos y los registros de los parámetros medidos tras someter a ambos grupos de ratas a diferentes estímulos durante 10 minutos.

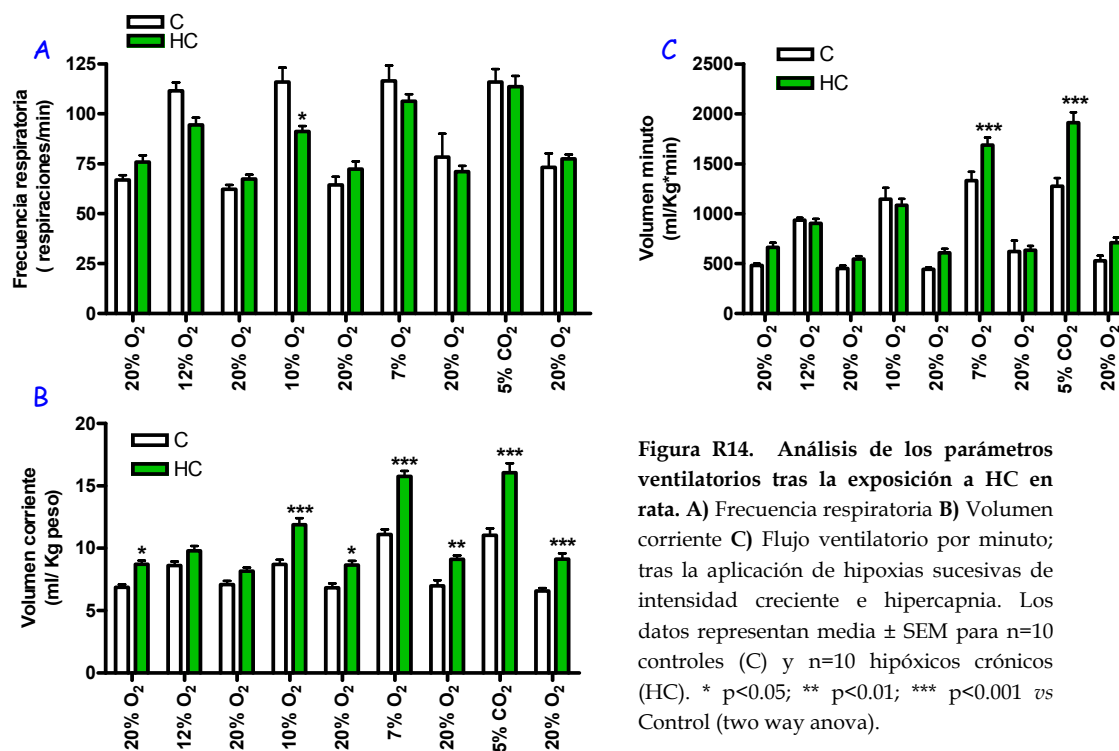


Figura R14. Análisis de los parámetros ventilatorios tras la exposición a HC en rata. A) Frecuencia respiratoria B) Volumen corriente C) Flujo ventilatorio por minuto; tras la aplicación de hipoxias sucesivas de intensidad creciente e hipercapnia. Los datos representan media \pm SEM para n=10 controles (C) y n=10 hipóxicos crónicos (HC). * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 vs Control (two way anova).

Como podemos observar se produce un aumento significativo del volumen corriente para todos los niveles de hipoxia en las ratas hipóxicas crónicas respecto a las controles normóxicas. Por el contrario la frecuencia respiratoria no varía cuando se comparan ambas poblaciones, aunque en ambos casos la frecuencia respiratoria aumenta durante la aplicación de hipoxias agudas de diferente intensidad e hipercapnia. En resumen, hemos constatado que las ratas están aclimatadas tras la exposición crónica a hipoxia sostenida en base a las diferencias observadas en la

ventilación total de los animales, debidas fundamentalmente al aumento del volumen corriente inspirado sin cambios aparentes en la frecuencia respiratoria.

6.2 PARTICIPACIÓN DE LOS CANALES DE Ca^{2+} EN LA REMODELACIÓN SUFRIDA POR EXPOSICIÓN A HIPOXIA CRÓNICA

Dado el carácter de continuidad de los experimentos de esta Tesis, en la **Figura R15** mostramos un resumen de los resultados previos del trabajo de Tesis Doctoral de Ana I. de Cáceres (2007).

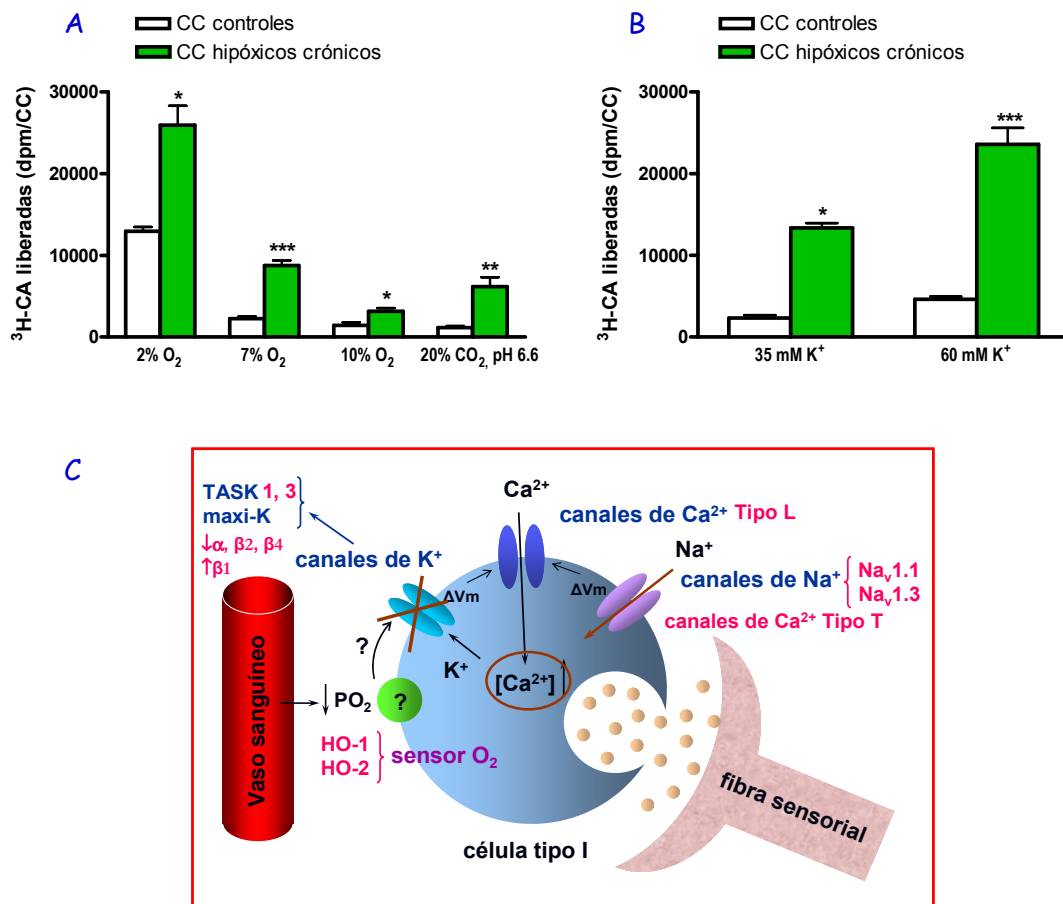


Figura R15. A y B. Sensibilización de la respuesta del CC de ratas expuestas a HC a diferentes estímulos. C. Modelo de transducción en el CC propuesto para la HC. (Tomado de Cáceres, 2007, Tesis Doctoral).

En primer lugar, aparte de los cambios morfológicos documentados durante la aclimatación a hipoxias prolongadas y la inducción de algunas enzimas tales como TH, se demuestran alteraciones funcionales llamativas como la sensibilización de la respuesta del CC a diferentes intensidades de hipoxia aguda,

acidosis hipercápnica y estímulos despolarizantes. Se demuestra inducción de la expresión de canales de Na^+ (Cáceres et al., 2009) y se ha sugerido remodelación de los canales de Ca^{2+} (Hempleman, 1996; Cáceres et al., 2009). Estos efectos podrían ser responsables del aumento de la excitabilidad de las CQ. En conjunto, los resultados encontrados en dicho estudio sobre los cambios de la expresión de diferentes canales llevaron a proponer un modelo de transducción en el que el aumento en la expresión de canales de K^+ tipo TASK (1 y 3) y de canales de Na^+ , junto con un remodelado en la expresión de las subunidades α y β del maxi- K^+ e inducción de HO-1, constituirían parte del mecanismo por el que aumenta la sensibilidad de estos quimiorreceptores durante la aclimatación a la HC.

En cuanto a los canales de Ca^{2+} , elementos clave en la transducción hipóxica, los de tipo L parecen seguir siendo los responsables de la entrada de Ca^{2+} que mantiene más del 90% de la respuesta secretora evocada por la hipoxia aguda en CC mantenidos en HC, al igual que sucede en los CC controles (Cáceres, 2007; Cáceres et al., 2009). En conjunto los resultados de la Tesis de Cáceres (2007) sugieren que en HC no se modifica sustancialmente la homeostasis del Ca^{2+} en el CC de rata en lo que se refiere a Ca^{2+} dependencia de la secreción, a la dependencia de voltaje de la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular y a la participación mayoritaria de canales tipo L en la entrada de calcio necesaria para promover la respuesta secretora a la hipoxia. Sin embargo es posible que la HC pueda alterar sus propiedades electrofisiológicas o sus niveles de expresión o ambos.

Aunque no hemos podido realizar medidas electrofisiológicas de los canales de Ca^{2+} en CC de ratas en hipoxia crónica, hemos dedicado un primer grupo de experimentos para medir la expresión de canales de Ca^{2+} tipo L en las CQ de CC de ratas en HC.

En la **Figura R16A** completamos un análisis previo realizado mediante RT-PCR a partir de RNA extraído de CC controles e hipóxicos crónicos, mostrando la presencia e inducción de la subunidad $\alpha 1\text{C}$ de los canales de Ca^{2+} tipo L ($\text{Ca}_v1.2$) en CC de ratas HC, pero no la de la isoforma $\alpha 1\text{D}$ ($\text{Ca}_v1.3$) (Cáceres et al., 2009). La **Figura R16B** muestra las bandas obtenidas por Western Blot con un anticuerpo frente a la subunidad $\alpha 1\text{C}$. Este análisis de expresión proteica se realizó a partir de CC congelados, homogenizados y fraccionados en geles de SDS-poliacrilamida al

8% según el protocolo detallado en Material y Métodos. Tras la transferencia húmeda y el bloqueo, las membranas se incubaron con un anticuerpo m-anti $Ca_v1.2$ (Santa Cruz Biotechnology, 1:250). Se utilizó como tejido control el ganglio cervical superior (GCS) y la β actina como control endógeno de carga (abcam, 1:1000). Las bandas visualizadas por quimioluminiscencia corresponden al tamaño esperado: \approx 220 KDa para $Ca_v1.2$ y 42 KDa para β actina. A pesar de que mediante RT-PCR se observa una ligera inducción del canal $Ca_v1.2$ en CC en HC dichos cambios no parecen correlacionarse con la expresión a nivel de proteína ya que en el Western Blot no hay cambios apreciables (**Figura R16B**, parte inferior).

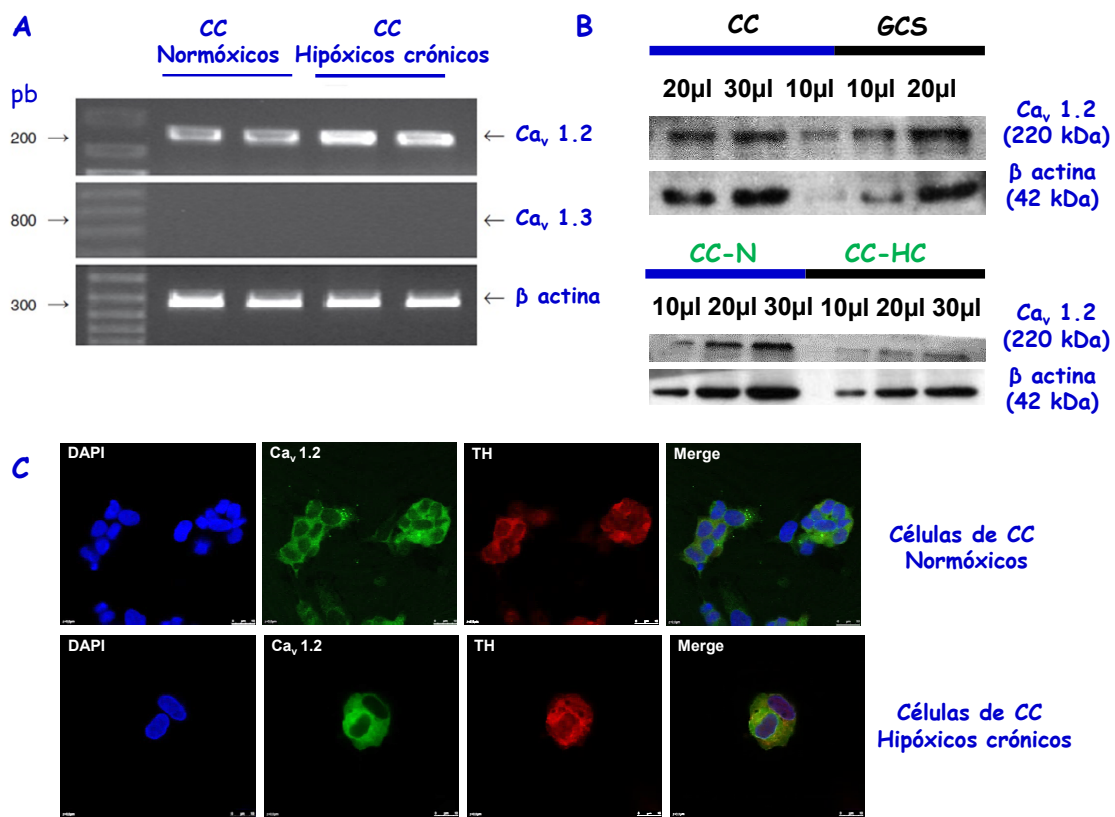


Figura R16. Expresión de canales de Ca^{2+} tipo L en CQ de CC de ratas normóxicas e hipóxicas crónicas. **A.** RT-PCR de canales de Ca^{2+} tipo L, $Ca_v1.2$ y $Ca_v1.3$, en CC de rata normóxicas e hipóxicas crónicas, con β actina como gen endógeno. (Tomado de Cáceres et al., 2009). **B.** Western blot de CC de rata normóxicas y GCS como tejido control (parte superior) y de CC de rata normóxicas frente a CC de rata hipóxicas crónicas (parte inferior). **C.** Inmunocitoquímica de CQCC de rata normóxicas e HC.

Finalmente, para verificar la localización de estos canales en las CQ, se realizaron experimentos de inmunocitoquímica en los que las imágenes fueron obtenidas por fluorescencia con doble marcaje con anticuerpos anti-TH y anti- $Ca_v1.2$, a partir de cultivos de 24 horas tras la disociación de CC de ratas controles e

HC. En la **Figura R16C** se muestran imágenes seleccionadas de 2 campos, el panel superior de células procedentes de CC normóxicos y el panel inferior de CC hipóxicos crónicos. En verde aparecen marcados los canales $Ca_v1.2$ (FITC), en rojo, la TH (Alexa-594) y en azul, los núcleos (DAPI). La última imagen de cada panel muestra la superposición de los tres. Se observa una localización más ubicua de los canales de Ca^{2+} respecto a la TH (CQ), aunque todas las células TH positivas lo son también para los canales $Ca_v1.2$. No hemos explorado los canales de tipo N porque desde el punto de vista de la secreción hemos visto que no son relevantes.

6.3 PAPEL DEL AMPc EN EL CC DE RATAS HIPÓXICAS

Aunque no descartamos un posible remodelado de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje en el proceso de aclimatación, consideramos que los resultados encontrados sobre homeostasis del Ca^{2+} , incluida la expresión de canales de Ca^{2+} , no revelaban cambios significativos que explicaran la sensibilización a la hipoxia. Los experimentos del grupo de Nurse realizados en CQCC de conejo mantenidas en cultivo en hipoxia sugieren que al menos la inducción de canales de Na^+ observada tras la exposición a HC está mediada por AMPc puesto que tales efectos son mimetizados por análogos del AMPc (Stea et al., 1992, 1995).

Dado que la hipoxia aguda produce aumento de los niveles de AMPc en el CC al mismo tiempo que los agentes que elevan los niveles de AMPc en el CC de conejo aumentan específicamente la liberación de CA inducida por hipoxia (Pérez García et al., 1990, 1991), hemos analizado la posibilidad de que la respuesta secretora aumentada en los CC sometidos a HC estuviera también mediada por cambios específicos de AMPc en dichas condiciones y en la activación de sus principales efectores, la PKA y Epac.

6.3.1 EFECTO DE LA HIPOXIA AGUDA SOBRE LOS NIVELES DE AMPc EN CC DE RATAS MANTENIDAS EN HIPOXIA CRÓNICA SOSTENIDA E INTERMITENTE

En primer lugar analizamos los niveles basales de AMPc y su activación por hipoxia aguda (7% O₂) en CC de ratas expuestas a hipoxia crónica sostenida e intermitente, comparándolos con CC de ratas controles normóxicas.

Para la realización de estos experimentos se procedió a la extracción de los CC y tras un periodo de preincubación de 30 min. en un baño metabólico con solución Tyrode-bicarbonato (pH=7.4, gaseo con 95% O₂/5% CO₂), se renovaron las soluciones y se re-incubaron (durante 20 min) gaseando con 7% O₂/5% CO₂/resto N₂, en presencia de IBMX 0.5 mM para inhibir las PDE. Para la aplicación del estímulo ácido se han utilizado maniobras experimentales tales como eliminar (0 mM HCO₃⁻) o aumentarlo (96mM) mediante sustitución equiosmolar con NaCl, gaseando con mezclas conteniendo 20% CO₂. Tras la homogenización de los CC y extracción del AMPc se procede a su cuantificación mediante un ensayo en placa que se realiza con un kit comercial de Amersham (cAMP Biotrak EIA System).

En la **Figura R17** se muestran los niveles de AMPc medidos en condiciones basales (95% O₂) e hipóxicas (7% O₂) en CC de ratas expuestas a condiciones ambientales normóxicas, hipoxia crónica sostenida (HC) o hipoxia crónica intermitente (HI).

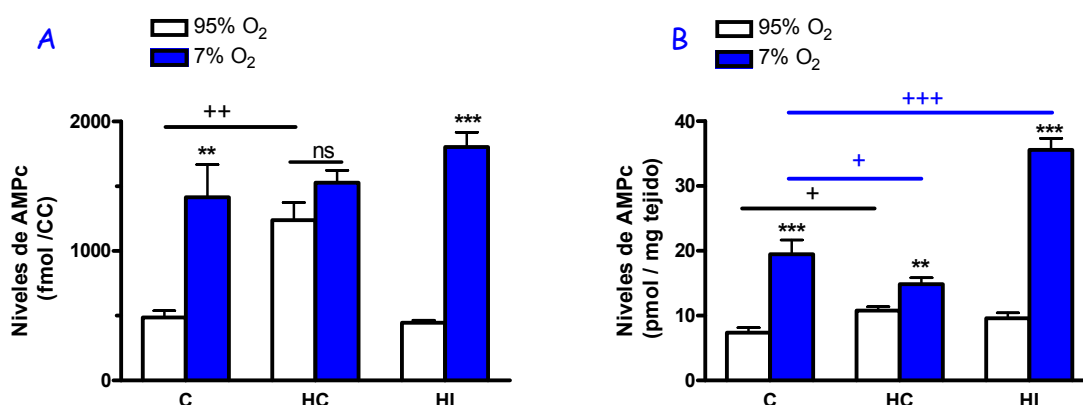


Figura R17. Efecto de la hipoxia (7% O₂) en CC de ratas expuestas a HC e HI frente a animales controles. **A.** Niveles de AMPc en fmol/CC. **B.** Valores normalizados por peso (pmol/mg tejido). Los datos representan media \pm SEM para n=16 hembras C, HC e HI. Análisis estadístico mediante two way anova (Bonferroni post test). ** p<0,01, *** p<0,001 vs 95% O₂; + p<0,05, ++ p<0,01, +++ p<0,001 vs Control.

Como se puede observar en la gráfica **R17A**, expresada en valores absolutos como fmoles totales de AMPc en el CC, la hipoxia aumenta de forma significativa, los niveles de AMPc tanto en ratas normóxicas (1414 ± 253 vs 486 ± 53 fmol/CC) como en ratas en HI (1802 ± 112 vs 446 ± 20 fmol/CC). En las ratas normóxicas, la hipoxia multiplica estos niveles por un factor de 3 con respecto a los valores basales y para las ratas en HI por un factor de 4, lo que nos indicaría una sensibilización de los CC tras el tratamiento. En los CC tratados con HC los niveles de AMPc basales están aumentados de forma significativa por un factor de más del doble y apenas aumentan tras la exposición a hipoxia aguda (1526 ± 95 vs 1239 ± 135 fmol/CC). Cuando se expresan los valores normalizados por mg de tejido (**Figura R17B**) las diferencias entre grupos se hacen más significativas. Los valores correspondientes a los CC expuestos a HC disminuyen cuando se expresa por mg de tejido con respecto a los otros dos grupos, debido a la hipertrofia del órgano.

Los datos de la **Figura R18** obtenidos tras inhibir las AC transmembrana con el SQ-22536 y la AC soluble con el KH7 muestran que la acumulación de AMPc en el CC está mediada por la activación de la adenilato ciclasa.

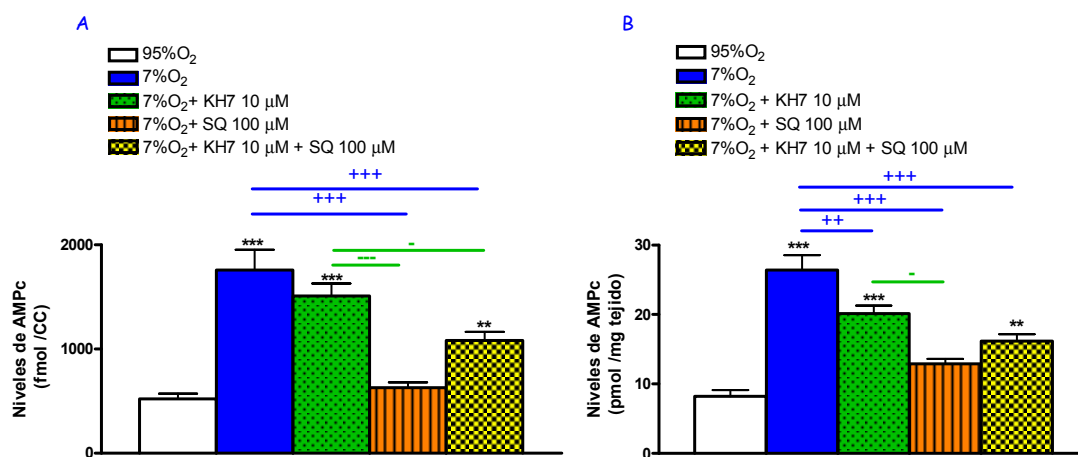


Figura R18. Efecto de los inhibidores de la AC transmembrana (SQ-22536) y soluble (KH7) sobre el aumento de AMPc inducido por hipoxia aguda (7% O₂) sobre CC de ratas controles. A. Valores absolutos de AMPc (fmol/CC). B. Valores normalizados por peso (pmol/mg tejido). Los datos representan media \pm SEM para n=8 en cada grupo C, HC e HI. Análisis estadístico mediante one way anova (Newman keuls post test). ** p<0,01, *** p<0,001 vs 95% O₂; ++ p<0,01, +++ p<0,001 vs 7% O₂; - p<0,05, --- p<0,001 vs 7% O₂ + KH7.

El inhibidor SQ-22536 a la concentración de 100 μM produce una disminución del aumento de AMPc evocado por la hipoxia próxima al 90%

(12.9 ± 0.7 vs 26.4 ± 2.1 pmol AMPc/mg CC), aproximándolo a los valores basales (8.2 ± 0.9 pmol AMPc/mg CC). El inhibidor de la AC soluble KH7 ($10 \mu\text{M}$) no produce ningún efecto significativo, al menos al expresar los resultados en valores absolutos (1511 ± 117 vs 1759 ± 196 fmol/CC), ni refuerza el efecto del SQ-22536. Ello indicaría que la AC soluble, aunque presente en CQ (Nunes et al., 2009), no participa en la transducción hipóxica. No obstante, no podemos descartar su participación en la activación del CC por la hipercapnia (Nunes et al., 2013).

6.3.2 EFECTO DEL pH /BICARBONATO SOBRE LOS NIVELES DE AMPc EN EL CC DE RATA

Para chequear el posible papel de esta AC soluble en el CC como posible sensor de pH/ HCO_3^- en la activación del CC por acidosis hipercápnica, hemos medido los niveles de AMPc en distintas condiciones de HCO_3^- y de pH. En la **Figura R19** mostramos los niveles de AMPc tras la estimulación ácida/hipercápnica, variando el pH o la concentración de bicarbonato, para analizar las posibles modificaciones en los niveles de AMPc en condiciones sólo de acidosis (0 mM bicarbonato, pH=6.8), acidosis hipercápnica (24 mM bicarbonato, pH=6.8, gaseo 20% CO_2) o hipercapnia isohídrica (96 mM bicarbonato, pH= 7.4, gaseo 20% CO_2).

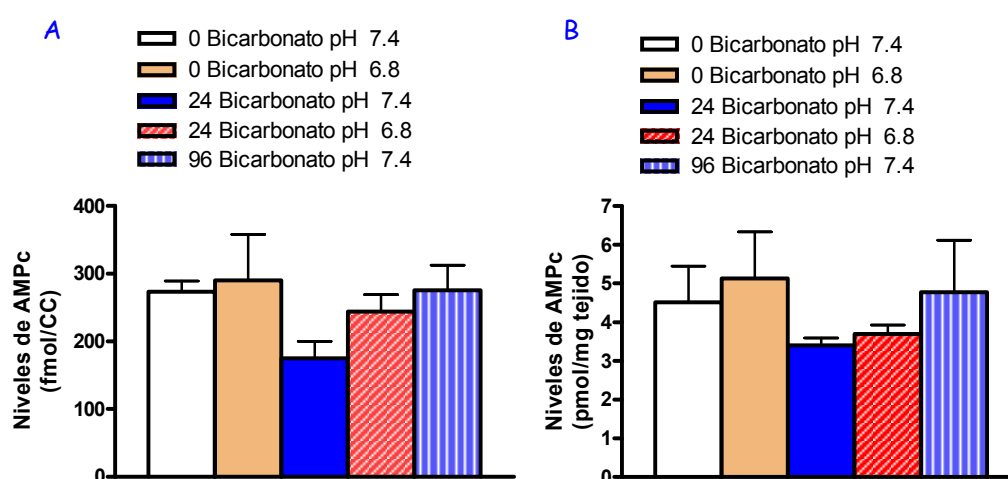


Figura R19. Efecto de la variación en los niveles de bicarbonato y de pH sobre los niveles de AMPc en el CC de ratas controles. **A.** Valores absolutos de AMPc (fmol/CC). **B.** Valores normalizados por peso (pmol/mg tejido). Los datos representan media \pm SEM (n=8 ratas).

Como puede observarse no existen variaciones significativas en los niveles de AMPc en ninguna de las situaciones estudiadas: ni por acidificación en ausencia de bicarbonato (0 mM bicarbonato/sin CO₂ pH=6.8), ni por acidosis hipercápnica (24 mM bicarbonato/20% CO₂ pH=6.8) ni por hipercapnia isohídrica (96 mM bicarbonato/20% CO₂ pH=7.4). Estos resultados están en consonancia con resultados previos en CC de conejo que muestran un aumento muy leve del AMPc en condiciones de acidosis hipercápnica (Pérez-García et al., 1990) y sugieren que la ACs, si está presente en las CQ, no tiene ningún papel fisiológicamente relevante ya que no aumenta los niveles de AMPc en respuesta a la hipercapnia isohídrica ni a la acidosis hipercápnica, a pesar de ser un sensor de la concentración de bicarbonato. Dada esta falta de respuesta obviamente no hemos probado el efecto del inhibidor KH7 como teníamos previsto.

6.3.3 PARTICIPACIÓN DE LA ADENILATO CICLASA EN LA ACTIVACIÓN DEL CC POR LA HIPOXIA AGUDA: MEDIDA DE LA RESPUESTA SECRETORA

En los experimentos que siguen hemos utilizado un enfoque experimental que ha consistido en medir la respuesta integrada del CC para verificar la implicación de la vía de señalización del AMPc en su activación por diferentes estímulos, hipoxia, acidosis y despolarización, en primer lugar en situación de normoxia y tras una situación de hipoxia mantenida (HC).

En la **Figura R20** se muestra el prototipo experimental, marcando previamente los depósitos de CA con ³H-Tyr y comparando la respuesta secretora, medida en periodos de 10 min, en ausencia o presencia de fármacos que potencien o inhiban una vía determinada. En concreto, en la **Figura R20A** se muestra el efecto de inhibir la AC sobre el curso temporal de la respuesta a la hipoxia (barras rojas en apartado E) en CC de ratas controles mientras que en la **Figura R20B** se muestra la respuesta en CC de ratas hipóxicas crónicas.

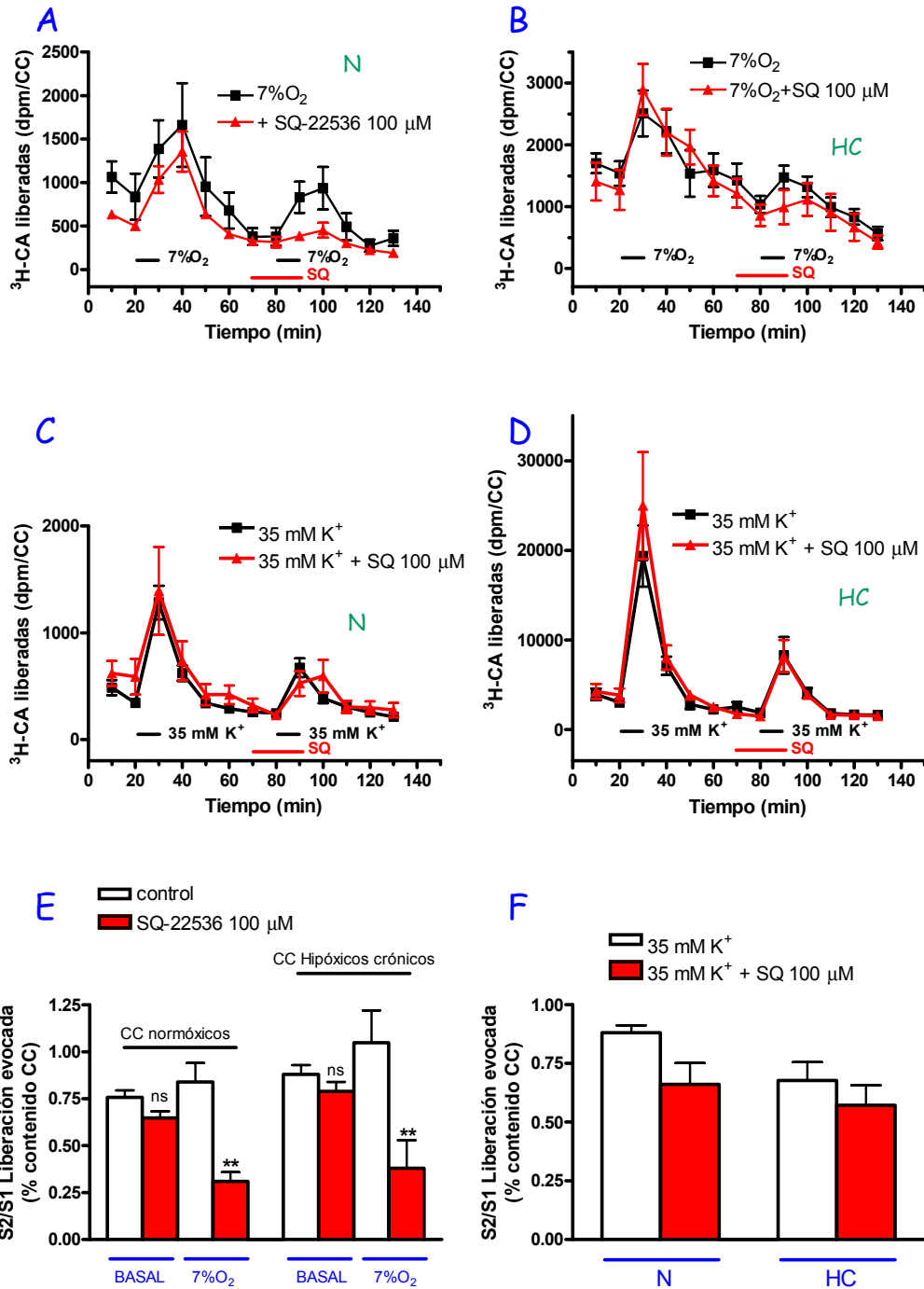


Figura R20. Efecto del SQ-22536 sobre la respuesta de las CC a la hipoxia (7% O₂) y a alto K⁺ (35 mM) en CC controles e HC. **A**. Efecto del inhibidor de la ACTm sobre la liberación de CA inducida por la hipoxia en CC de ratas normóxicas. **B**. Efecto del inhibidor de la ACTm sobre la liberación de CA inducida por la hipoxia en CC de ratas HC. **C**. Efecto del inhibidor de la ACTm sobre la liberación de CA inducida por alto K⁺ (35 mM) en CC de ratas normóxicas y **D**, en CC de ratas HC. **E**. Liberación evocada, expresada como % contenido del CC, en ausencia y presencia del inhibidor (SQ-22536) en condiciones basales y de estimulación hipóxica. (** p<0.01 vs control). **F**. Liberación evocada, expresada como % contenido del CC, en ausencia y presencia del inhibidor de la ACTm (SQ-22536) tras la aplicación de un estímulo despolarizante (35 mM K⁺). Los valores son medias de 12 CC ± SEM.

El SQ-22536 a 100 μM produce una disminución de la secreción de $^3\text{H-CA}$ sin alterar su curso temporal, tanto en CC controles como en hipóxicos crónicos. La magnitud de la inhibición se aprecia mejor comparando los cocientes de la liberación evocada, expresada en % del contenido, en los dos ciclos de estimulación (S2/S1) para CC controles e HC, tal y como se muestra en la **Figura R20E**.

Como puede observarse, el inhibidor de la AC no afecta a la secreción basal en ninguna de las dos situaciones experimentales utilizadas, pero inhibe la respuesta secretora frente a la hipoxia en aproximadamente un 60% (0.31 ± 0.05 vs 0.84 ± 0.10 ; ** $p<0.01$) en CC de ratas controles manteniendo el mismo porcentaje de inhibición en CC de ratas HC (0.38 ± 0.15 vs 1.05 ± 0.17 ; ** $p<0.01$), aun cuando los niveles basales y estimulados son muy diferentes en ambas situaciones como puede apreciarse en la **Fig. R20A y R20B**. Por el contrario no afecta a la liberación inducida por el estímulo despolarizante de alto K^+ (**Figuras R20C, D y F**) revelando un efecto específico de la AC-AMPC en la respuesta del CC a la hipoxia.

6.3.4 PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA A (PKA) EN LA ACTIVACIÓN DEL CC POR LA HIPOXIA AGUDA: MEDIDA DE LA RESPUESTA SECRETORA

Una vez demostrada la participación de la AC/AMPC en la cascada de transducción hipóxica en el CC, quisimos demostrar si este aumento del AMPC promovido por la hipoxia activaba a su vez la vía de la PKA u otros efectores alternativos, tal como habíamos descrito en CC de conejo (Rocher et al., 2009).

En la **Figura R21A** se muestra el efecto del inhibidor de PKA más utilizado, el H89, a dos concentraciones diferentes: 1 y 10 μM sobre la respuesta secretora al 7% O_2 . Al analizar la liberación evocada (**Figura R21B**), se observa que mientras H89 a concentración de 1 μM no afecta a la liberación de $^3\text{H-CA}$, la aplicación de una dosis de 10 μM , usada habitualmente (Thompson y Wyatt, 2011), produce una potenciación muy significativa del estímulo hipóxico.

En la **Figura R21C y R21D** se muestra de forma análoga un curso temporal de la liberación de $^3\text{H-CA}$ en CC de ratas expuestas a HC utilizando H89 a 1 o 10

μM en el segundo ciclo de estimulación hipóxica. Ambas dosis de H89 producen el mismo comportamiento que en CC normóxicos: la dosis baja no afecta significativamente a la respuesta a la hipoxia y el efecto de la dosis alta parece sospechosamente tóxico. Esto nos llevó a pensar en posibles efectos inespecíficos de esta droga ya descritos; en concreto, se sabe que inhibe al menos otras 8 quinasas y además posee un gran número de efectos independientes de la PKA (Murray, 2008; Lochner y Moolman, 2006; Di Benedetto et al., 2013).

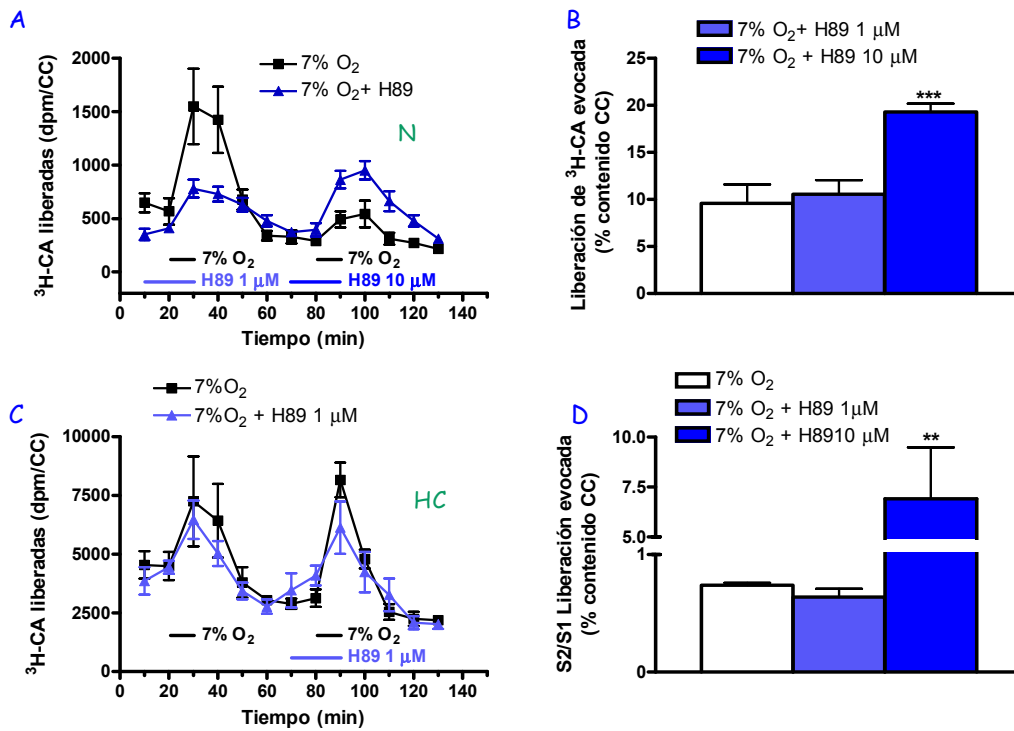


Figura R21. Efecto del H89 (1 y 10 μM) sobre la respuesta de las CQ a la hipoxia (7% O₂) en CC controles e HC. **A.** Curso temporal del efecto del inhibidor de la PKA sobre la liberación de ³H-CA inducida por la hipoxia en CC controles (de ratas normóxicas). **B.** Efecto sobre la liberación evocada en CC controles. **C.** Efecto del inhibidor de PKA en CC de ratas en HC. **D.** Efecto sobre la liberación evocada en CC de ratas en HC. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs 7% O₂). Los valores son medias de 12 CC \pm SEM (one way anova, Newman Keuls post test).

Debido a estos resultados, probamos el efecto de inhibidores alternativos de la PKA, así como el de un activador de la misma. Entre ellos, hemos seleccionado el KT-5720, inhibidor de la subunidad α de la PKA, y el Rp-cAMPs, análogo del AMPc, que inhibe de forma competitiva la activación de la quinasa. Por último, como activador hemos utilizado el 6-Bnz-cAMP capaz de potenciar la señalización mediada por PKA en otras preparaciones (Braun et al., 1998). En la **Figura R22** se observa que ni el KT-5720 ($0,95 \pm 0,083$ vs $0,74 \pm 0,02$) ni el Rp-cAMPs ($0,69 \pm 0,07$ vs

0,74±0,02) modifican la respuesta a la hipoxia de forma significativa en CC de ratas en HC. En la misma gráfica se muestra la falta de efecto del activador específico de la PKA, el 6 Bnz-AMPC (0,66±0,16 *vs* 0,74±0,02). Estos resultados, en conjunto, apuntan hacia la exclusión de la vía de la PKA como vía implicada en la cascada de transducción del estímulo hipóxico y ratifican la idea de que el H89 a 10 µM produce un efecto inespecífico sobre dichas células.

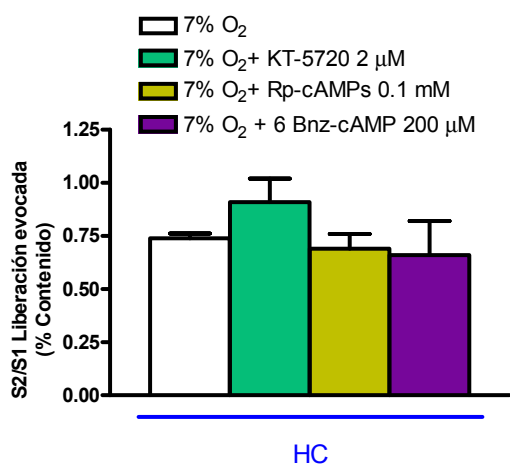


Figura R22. Implicación de la vía AMPc-PKA en la respuesta a la hipoxia (7% O₂) en CC de ratas hipóxicas crónicas. Efecto de los inhibidores KT-5720 (2 µM) y Rp-cAMPs (0.1 mM) y del agonista selectivo 6 Bnz-AMPC (200 µM). Los valores son medias de 12 CC ± SEM.

En la **Figura R23** se recogen los resultados obtenidos con el inhibidor H89 sobre la estimulación con alto K⁺ (35 mM) en CC de ratas normóxicas e HC. Como en el caso de la hipoxia, la dosis alta de H89 (10 µM) produce un aumento en la secreción opuesto al esperado.

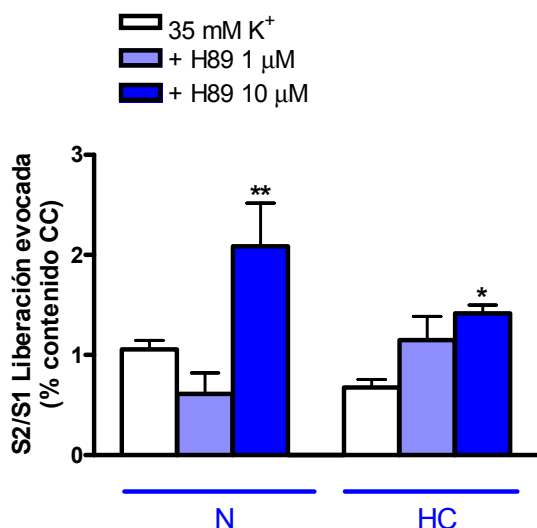


Figura R23. Estudio de la vía AMPc-PKA en la respuesta a alto K⁺ (35 mM) en CC de ratas normóxicas e HC. Efecto del inhibidor de PKA: H89 a las dos dosis utilizadas (1 y 10 µM). Los valores son medias de 12 CC ± SEM.

Este aumento de la secreción no parece ligado a la inhibición de la PKA ya que la inhibición de la síntesis de AMPc que conduciría a la inhibición de la PKA

no afecta a la liberación inducida por K^+ (**Figura R20**). En resumen, los efectos de los inhibidores de PKA en CC o no tienen efecto o cuando los hay, son inespecíficos.

6.3.5 PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA EPAC EN LA ACTIVACIÓN DEL CC POR LA HIPOXIA AGUDA

Los hallazgos indicando que el AMPc potencia la respuesta secretora promovida por la hipoxia de manera independiente de la vía clásica de señalización mediada por PKA nos llevaron a estudiar la vía alternativa de señalización por AMPc a través de proteínas Epac. Desde la década del 2000 se conocía la regulación de procesos excitotóxicos por esta proteína, de forma independiente de la PKA (Kang et al., 2003; Kashima et al., 2001; Sudhof, 2004), y además, estudios previos de nuestro laboratorio en CC de conejo, la implicaban en la vía de señalización hipóxica (Rocher et al., 2009).

Para comprobar esta hipótesis, en primer lugar procedimos a medir el efecto del único inhibidor de Epac descrito hasta ese momento, la brefeldina A (BFA), sobre la respuesta a la hipoxia en CC de ratas normóxicas e hipóxicas. En la **Figura R24A** se muestra el curso temporal del efecto de la BFA en CC de ratas normóxicas y en **R24C** el cociente S2 (presencia)/S1 (ausencia) tanto en normoxia como en HC para el estímulo hipóxico (7% O_2). En CC de ratas normóxicas, la BFA inhibe aproximadamente un 30% la liberación de CA (0.53 ± 0.07 vs 0.84 ± 0.10); y en CC de ratas en HC los resultados son similares ($0,58 \pm 0,08$ vs $1,05 \pm 0,17$). Por el contrario, la BFA no afecta la respuesta del CC al alto K^+_e (datos no mostrados) sugiriendo que la vía del Epac se activa de forma específica por hipoxia.

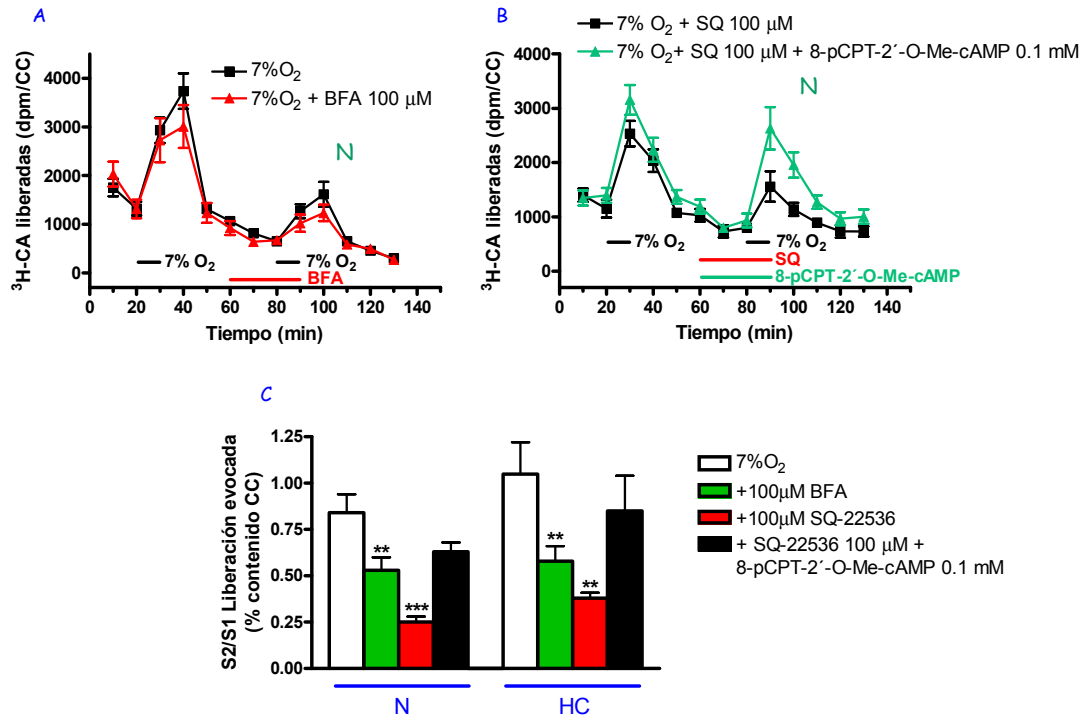


Figura R24. Participación de la vía AMPc-Epac sobre la respuesta secretora a la hipoxia (7% O₂) en CC de ratas normóxicas e HC. **A.** Efecto del inhibidor BFA (100 μM) sobre la respuesta al 7% O₂. **B.** Efecto de la aplicación simultánea del 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (0.1 mM) + SQ-22536 (100 μM). **C.** Resumen S2/S1 como liberación evocada con el inhibidor de Epac, BFA y el activador 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP junto con la inhibición de AC. (** p<0.01; *** p<0.001 vs 7% O₂). Los valores son medias de 6-8 CC ± SEM.

En un grupo nuevo de animales normóxicos e hipóxicos, chequeamos el efecto de un activador selectivo de Epac, el 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (ESCA), sobre la respuesta al 7% O₂, no encontrando ningún efecto significativo sobre dicha respuesta (datos no mostrados). La ausencia de efecto del activador de Epac no nos sorprendió ya que conocíamos que a este nivel de estimulación hipóxica el aumento de AMPc endógeno es máximo, al menos en CC de conejo (Pérez-García et al., 1990) y, por tanto, la activación endógena de la vía del Epac debería ser también máxima o casi máxima. Por ello, en otro nuevo grupo experimental comparamos el efecto del activador de Epac sobre CC tratados con el inhibidor de la AC (SQ-22536) frente al efecto del inhibidor solo (**Fig. R24B**). Dichos experimentos demostraron que el activador de Epac es capaz de revertir el efecto de la inhibición de la AC (0.63 ± 0.05 vs 0.25 ± 0.03 ; *** p<0.001), lo que demuestra la presencia y funcionalidad de esta vía en el CC tanto de ratas normóxicas como

hipóxicas, y su participación en la señalización del estímulo hipóxico, confirmado por su sensibilidad a BFA.

6.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE EPAC MEDIANTE WESTERN BLOT

El análisis de expresión proteica mediante Western Blot se realizó a partir de CC congelados, homogenizados y fraccionados en geles de SDS-poliacrilamida al 10%. La carga de los pocillos se realizó utilizando entre 4-6 CC por calle. El GCS se utilizó como tejido control no quimiorreceptor. Una vez realizada la transferencia húmeda y el bloqueo, las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios monoclonales anti-Epac 1 y anti-Epac 2 (dilución 1:100; Cell Signalling) y anti- β actina (dilución 1:5000 Abcam). Se utilizó la expresión de β actina como control endógeno de carga.

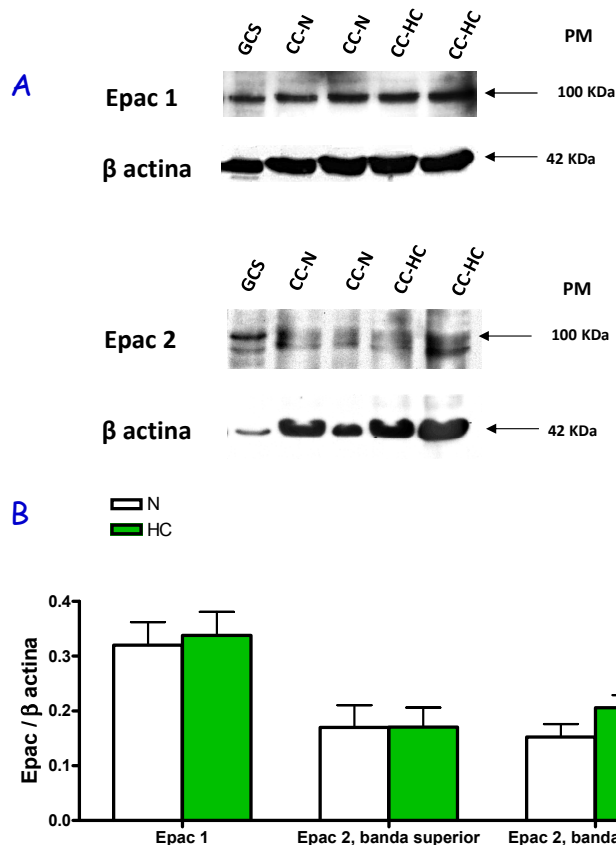


Figura R25. A. Western blot representativo de Epac 1 y Epac 2 en CC y GCS de ratas controles e HC. **B.** Análisis semicuantitativo de los cambios de expresión en CC de ratas en HC, expresados como Epac/ β actina de la densidad óptica de su banda (n=5-11).

En la **Figura R25** se visualizan bandas del PM esperado: \approx 100 KDa para Epac 1 y Epac 2 y 42 KDa para β actina. Los experimentos fueron reproducidos 10-12 veces probando diferentes anticuerpos, monoclonales y policlonales, para ambas

isoformas de Epac. La optimización de las condiciones fue costosa debido al pequeño tamaño de la muestra de partida (50 $\mu\text{g}/\text{CC}$) y a la baja abundancia de estas proteínas en el CC.

Epac 1 aparece como la isoforma más abundante en el CC, pero dado que cada isoforma se detecta con un anticuerpo diferente, en principio no sería un dato concluyente. Epac 2 aparece como una banda desdoblada, más difícilmente perceptible en el inmunoblot. Para analizar los posibles cambios de expresión de Epac tras el tratamiento hipóxico y dado el diferente tamaño de los CC normóxicos e hipóxicos, los valores obtenidos se han normalizado por la carga de proteínas, utilizando la densidad óptica de las bandas de β actina y calculando el cociente Epac/ β -actina, como se muestra en la **Figura R25B**.

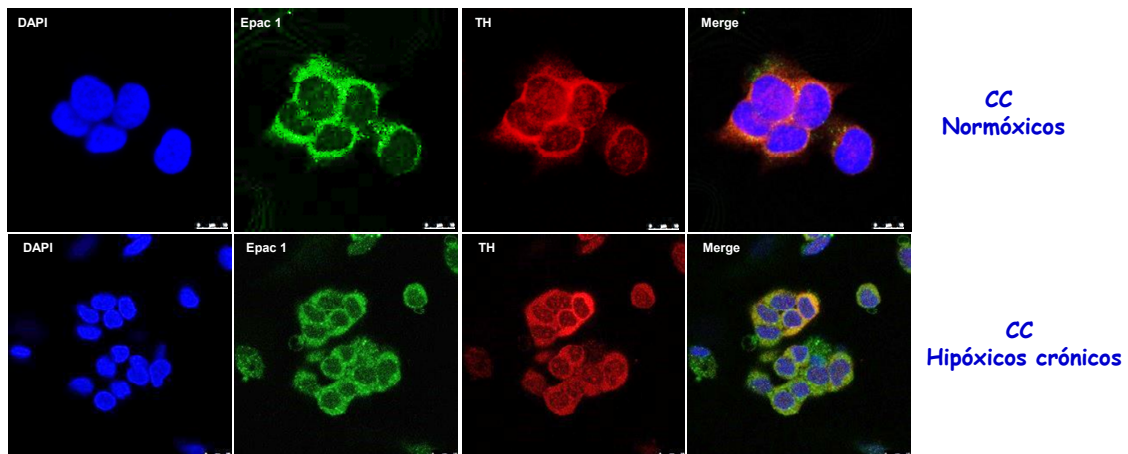
No se observan cambios significativos en la expresión de Epac 1 ($0,34\pm 0,04$ en HC *vs* $0,32\pm 0,04$ en controles). Respecto a Epac 2, sólo la banda inferior muestra un aumento de expresión del 40% tras el tratamiento con HC ($0,21\pm 0,02$ en HC *vs* $0,15\pm 0,02$ en C; * $p<0.05$).

Estos datos son coherentes con el hecho de que Epac 1, a nivel de RNAm, está más ampliamente distribuido que Epac 2, más restringido a los tejidos neurales. Nuestros datos apuntan hacia una expresión predominante de Epac 1 de forma constitutiva y de Epac 2 inducible por hipoxia. El desdoblamiento de Epac 2 podría deberse a la presencia de dos isoformas generadas por *splicing* alternativo como se ha descrito recientemente: Epac 2A y Epac 2B (Niimura et al., 2009). Aunque no está claro si este patrón de expresión dinámica tiene alguna importancia funcional, al menos sugiere distintos papeles para Epac 1 y Epac 2 en el CC.

6.5 LOCALIZACIÓN DE EPAC MEDIANTE INMUNOCITOQUÍMICA

Tras demostrar la expresión de las proteínas Epac 1 y Epac 2 en el CC de rata, comprobamos si éstas se expresaban en las CQ. Para ello estudiamos su colocalización con un marcador de CQ, la tirosina hidroxilasa (TH; **Figura R26**).

A Epac 1



B Epac 2

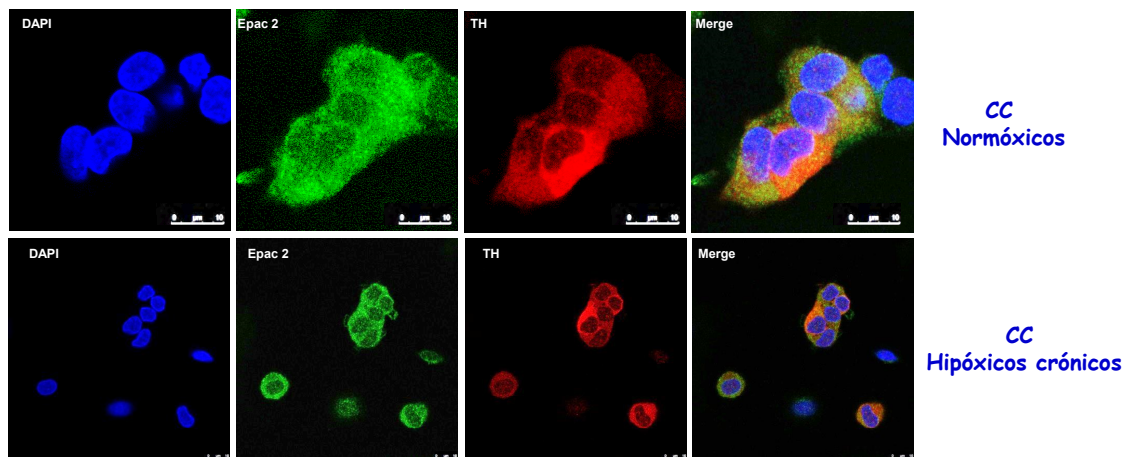


Figura R26. Co-Localización de Epac 1 y Epac 2 con TH mediante inmunofluorescencia en células disociadas de CC de ratas control y hipóxicas crónicas. **A.** Muestra la expresión de Epac 1 (verde) y TH (rojo) en células de CC control y HC. **B.** Muestra la expresión de Epac 2 y TH en una preparación similar. En la última imagen de cada panel aparecen superpuestas las imágenes anteriores (Merge). La incubación sin anticuerpo primario (blanco) no dio señal (datos no mostrados).

En la **Figura R26** se muestran las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de fluorescencia en células disociadas de CC control y HC con anticuerpos anti-TH y anti-Epac 1 y anti-Epac 2. Se utilizaron los mismos anticuerpos monoclonales que en los Western blots, anti Epac 1 (1:50) y anti Epac 2 (1:50) y con un anticuerpo policlonal anti-TH (1:1000). Los anticuerpos secundarios anti-IgG (1:1000) estaban conjugados con Alexa 594 (rojo) y FITC (verde), a los que se incluyó DAPI (1:8000) para marcar los núcleos. Como puede observarse en los diferentes paneles, hay colocación de Epac 1 y Epac 2 con TH, lo que indica su presencia en las CQ de CC de rata, así como una clara localización citoplasmática

tanto en las CQ de CC normóxicos como de HC. Otras células negativas para TH, es decir no quimiorreceptoras, expresan también Epac 1 y Epac 2.

6.6 EFECTO DE INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE EPAC 1 Y EPAC 2 SOBRE LA RESPUESTA DEL CC A LA HIPOXIA

En Octubre del 2012, cuando ya habíamos realizado los experimentos de inhibición con la BFA, aparecieron en el mercado nuevos inhibidores específicos de Epac 1 y Epac 2, a partir del trabajo de síntesis realizado por un laboratorio de Tejas (Chen et al., 2012). Rápidamente, probamos el efecto de dichos inhibidores sobre la actividad del CC de ratas normóxicas con el propósito, primero, de ratificar los resultados con BFA y segundo, comprobar si podíamos distinguir si los efectos eran mediados por una u otra isoforma, para después ampliar el estudio a nuestro modelo experimental de CC de ratas en HC.

En la **Tabla RIV** se muestran estos nuevos inhibidores de las proteínas Epac, así como su especificidad con respecto a una u otra isoforma.

Tabla RIV. INHIBIDORES DE PROTEÍNAS EPAC	
Inhibidor	Especificidad
<p>ESI-05</p> <p>4- Metilfenil- 2, 4, 6- trimetilfenilsulfona</p>	Inhibidor selectivo de Epac 2
<p>HJC0197</p> <p>4- Ciclopentil- 2- (2, 5- dimetilbencilsulfanil)- 6- oxo- 1, 6- dihidropirimidina- 5- carbonitrilo</p>	Inhibidor de Epac 1 y Epac 2
<p>ESI-09</p> <p>3- [5- (tert.- Butil)isoxazol- 3- il]- 2- [2- (3- clorofenil)hidrazono]- 3- oxopropanonitrilo</p>	Inhibidor de Epac 1 y Epac 2

En primer lugar probamos los dos inhibidores de Epac que inhibían tanto a Epac 1 como a Epac 2, ESI-09 y HJC0197, sobre la liberación de CA evocada por 7% O₂. En la **Figura R27** observamos que con ambos inhibidores, a las dosis

recomendadas por los farmacólogos fabricantes, se produce un marcado efecto sobre la liberación basal independientemente de la aplicación del estímulo, sugiriendo un efecto tóxico sobre el CC. Por tanto consideramos dichas sustancias inadecuadas para nuestra preparación.

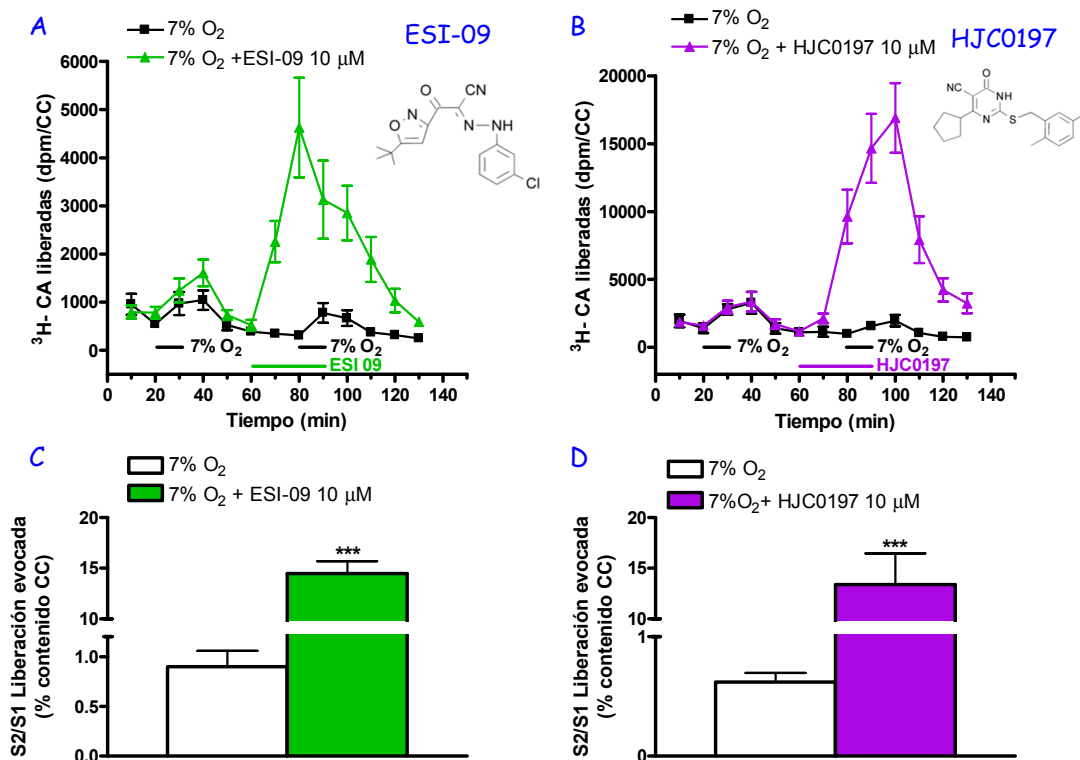


Figura R27. Efecto del inhibidor ESI-09 (10 μM) y HJC0197 (10 μM) sobre la liberación de ³H-CA en respuesta a 7% O₂ en CC de ratas normóxicas. A y B. Cursos temporales de liberación de CA con aplicación en el segundo estímulo de cada uno de los inhibidores. C y D Liberación evocada de ³H-CA expresada como cociente S2/S1. Los valores son medias de 12 CC ± SEM. (***) p<0.001 vs 7% O₂).

Respecto al tercer inhibidor, ESI-05, específico de Epac 2, en la **Figura R28** se muestra su efecto a 10 μM (A) y 20 μM (B) sobre la liberación de ³H-CA evocada por 7% O₂, y en la parte C, la liberación evocada de ³H-CA expresada como cociente S2/S1 para las dos concentraciones utilizadas. Como puede observarse, la aplicación de 10 μM de ESI-05 no produjo ningún efecto significativo, por lo que en otro grupo experimental utilizamos una dosis de 20 μM, obteniendo resultados similares. De estos resultados concluimos que o bien Epac 2 no participa en la señalización de la cascada de transducción del estímulo hipóxico, o bien la droga no es adecuada para nuestra preparación.

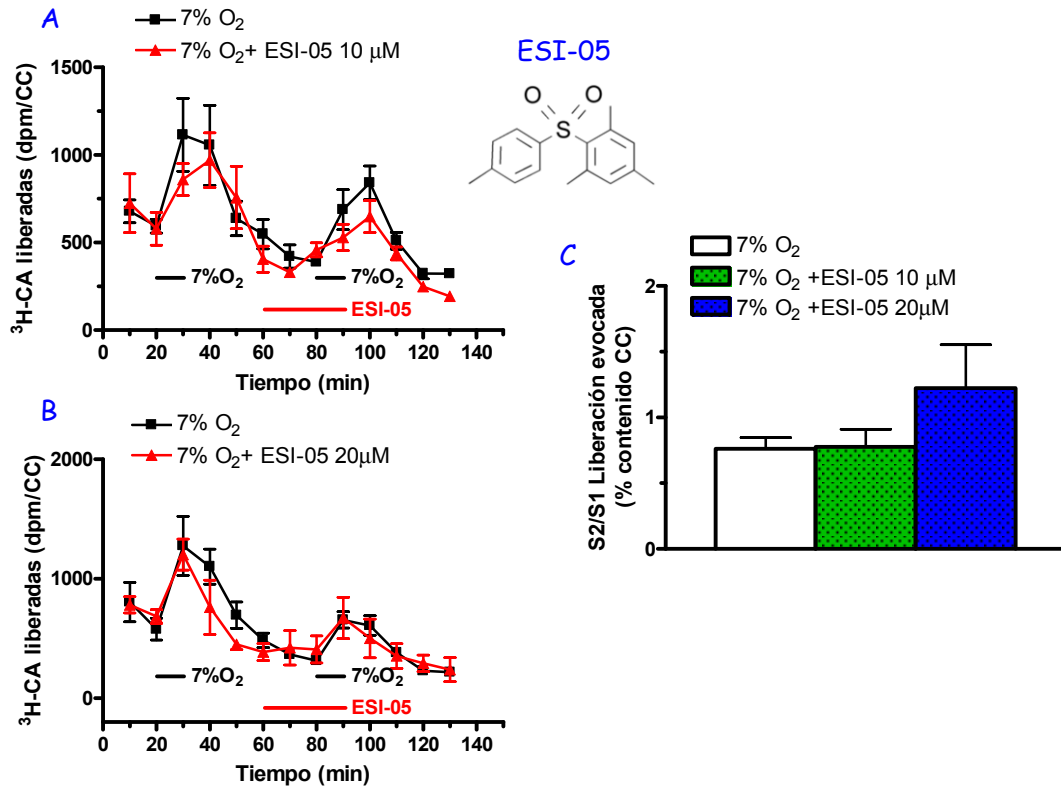


Figura R28. Efecto del inhibidor de Epac 2, ESI-05 (10 y 20 μM), sobre la liberación de ³H-CA en respuesta a 7% O₂ en CC de ratas controles. A. Curso temporal de liberación con una dosis de 10 μM, durante 30 min, en S2. B. Curso temporal de liberación con una dosis de 20 μM, durante 30 min, en S2. C. Resumen de la liberación evocada de ³H-CA expresada como cociente S2/S1. Los valores son medias de 12 CC ± SEM.

En conclusión, puesto que el inhibidor específico de Epac 2 no produce ningún efecto y los inhibidores de Epac 1 muestran un posible efecto tóxico sobre el CC, afectando a la liberación basal, estos nuevos inhibidores sintéticos en principio muy prometedores, no nos han permitido establecer la participación de una o ambas isoformas de Epac en la vía de señalización activada por la hipoxia en el CC de rata.

6.7 EFECTO DE INHIBIDORES ESPECÍFICOS DE AC Y DE EPAC SOBRE LA RESPUESTA DEL CC A LA ACIDOSIS HIPERCÁPNICA EN NORMOXIA E HIPOXIA CRÓNICA

Los primeros resultados obtenidos en nuestro laboratorio respecto al estudio de los efectos de la hipoxia crónica sostenida en el CC de rata (Cáceres, 2007, Tesis Doctoral) revelaron que no sólo se producía sensibilización de la respuesta a la hipoxia aguda, sino que también ocurría, y en mayor grado incluso, en la respuesta a la acidosis hipercápnica, tanto a nivel del CC *in vitro* como a nivel de ventilación en el animal entero. Aunque los resultados previos de nuestro grupo mostraron que el estímulo ácido modificaba poco (Pérez García et al., 1990) o nada (**Figura R19** de esta Tesis) los niveles de AMPc, el grupo de Nurse había sugerido que el aumento de AMPc en HC podía ser responsable de muchos de los efectos observados en el CC mantenido en HC (Stea et al., 1992, 1995). Por ello, quisimos probar si la vía del AMPc/Epac pudiera participar en la señalización del estímulo ácido y por tanto en la sensibilización a la acidosis observada tras el tratamiento de hipoxia sostenida.

En la **Figura R29A** se muestra el efecto de la inhibición de la ACtm con SQ-22536 sobre el curso temporal de liberación de ³H-CA para un estímulo del 20% CO₂ (pH 6.6) en CC de ratas mantenidas en HC. Aunque el SQ-22536 no afecta a la secreción basal (5% CO₂), inhibe de forma significativa en más de un 50% (0.31 ± 0.57 vs 0.73 ± 0.20 % contenido CC; ** $p < 0.01$) la secreción inducida por la acidosis hipercápnica (20% CO₂). En la **Fig. R29B** se demuestra además la reversión de dicho efecto inhibitorio mediante el activador de Epac, el 8 pCPT-2'-O-Me-cAMP (ESCA 100 μ M). Hay que señalar que dichos efectos sólo se observan en CC de ratas mantenidas en HC ya que ni el SQ-22536 ni el ESCA tienen efecto sobre CC de ratas controles. El resumen de dichos resultados se muestra en la **Fig. R29C** en forma de cocientes de la liberación evocada en presencia o ausencia de dichas drogas.

Estos datos en su conjunto nos llevan a concluir que la vía AMPc-Epac no participa en la transducción del estímulo ácido hipercápnico en el CC de ratas

normóxicas, pero parece estar fuertemente implicada en la señalización del estímulo ácido en los CC adaptados a la hipoxia crónica mantenida.

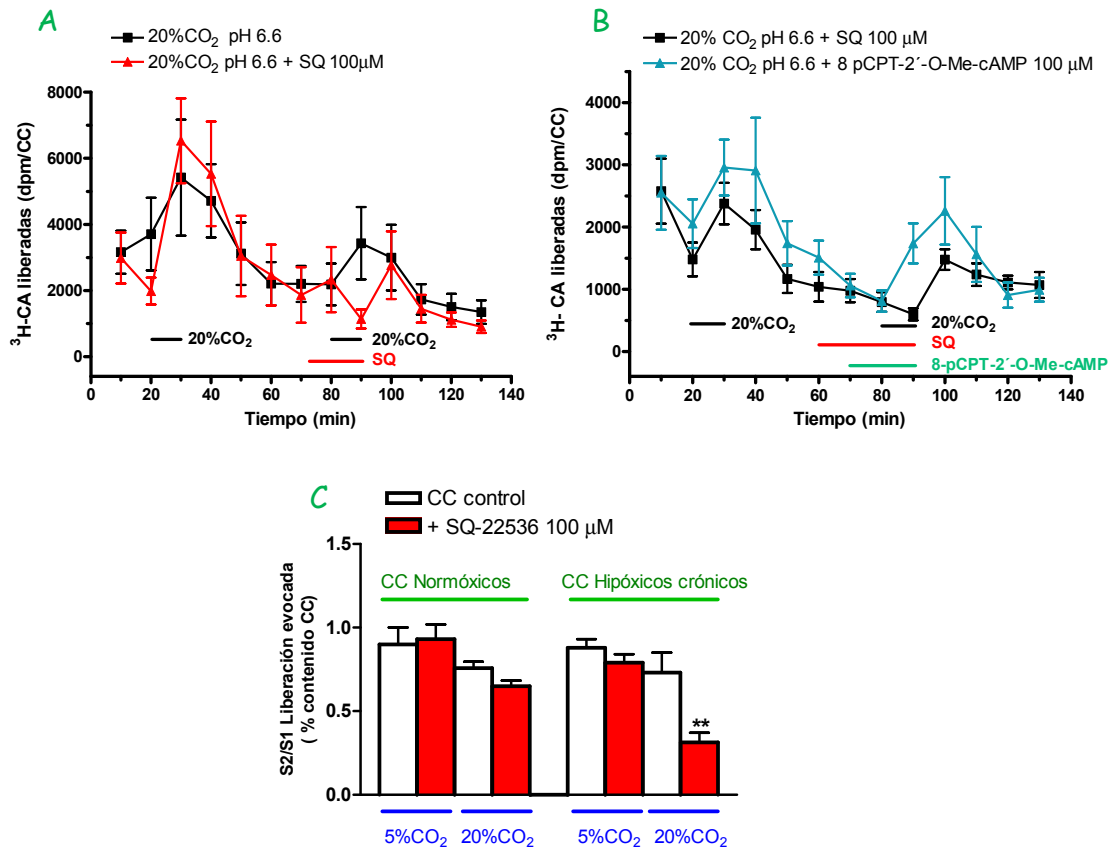


Figura R29. Efecto del SQ-22536 y del 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre la respuesta de CC en HC a la acidosis hipercápnica (20% CO₂ pH 6.6). **A.** Curso temporal y efecto del inhibidor de la ACTm (SQ-22536) sobre la liberación de ³H-CA inducida por acidosis. **B.** Efecto del 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP sobre la inhibición por SQ-22536 en la respuesta a la acidosis. **C.** Resumen del efecto del SQ-22536 sobre cocientes de liberación evocada de ³H-CA en condiciones basales y en acidosis hipercápnica (***p*<0.01 vs control). Los valores son medias de 12 CC ± SEM.

Como ya hemos señalado en la Introducción, recientemente se ha descrito la presencia de una forma de AC soluble en el CC de rata. Puesto que se sabe que dicha AC actúa en muchos tipos celulares como sensor de HCO₃⁻ nos propusimos probar el efecto de un inhibidor específico de esta ACs, el KH7, sobre la respuesta inducida por la acidosis hipercápnica (20% CO₂, pH 6.6), de forma aislada y de forma conjunta con el inhibidor de la AC de membrana (SQ-22536). Como se observa en la **Fig. R30A** y **R30B**, el KH7 aplicado a la dosis habitual encontrada en la bibliografía (10 μM; Kumar et al., 2009), o de manera conjunta con el SQ-22536, produce un aumento de secreción del 250% de forma independiente del estímulo.

Datos muy similares se obtuvieron con un estímulo hipóxico, como se muestra en la Fig. R30C, en CC de ratas hipóxicas crónicas pero también en CC normóxicos (datos no mostrados), llevándonos a la conclusión de que el KH7 actúa de forma inespecífica sobre las CQCC con efectos independientes de la ACs (Bitterman et al., 2013; Tian et al., 2011).

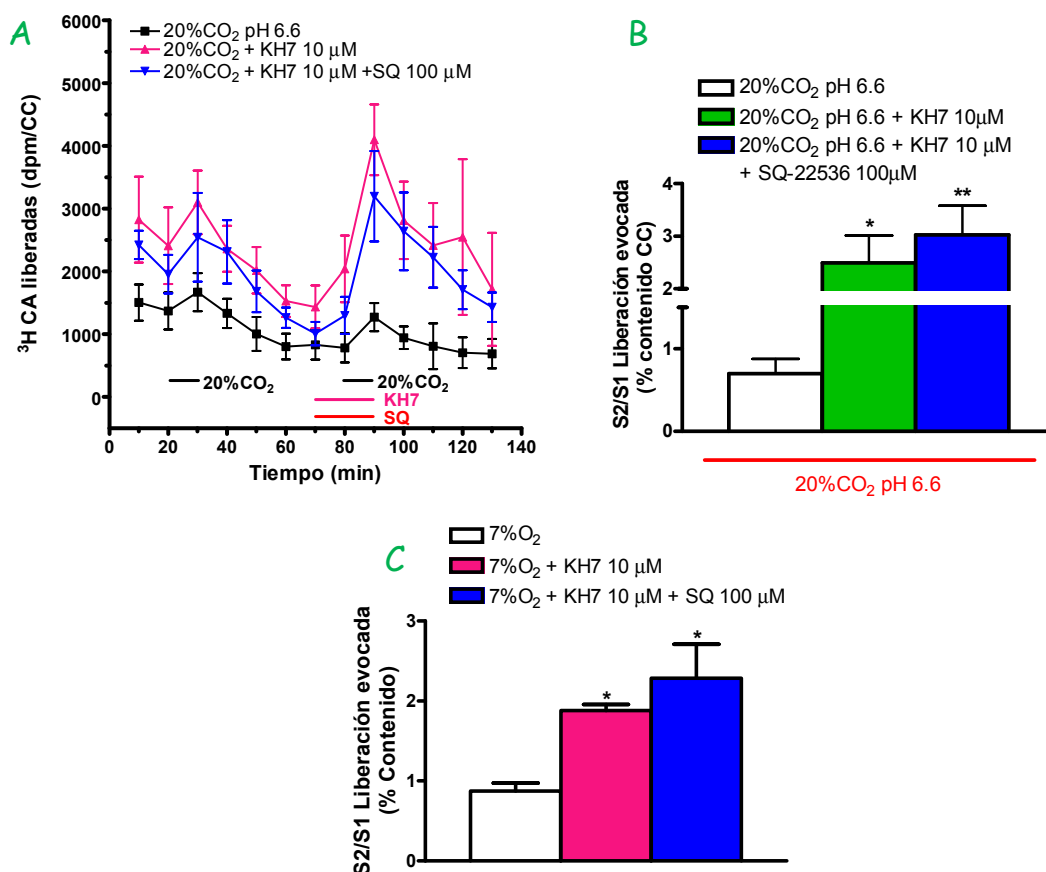


Figura R30. Efecto del inhibidor de la ACs (KH7) sobre la respuesta secretora del CC frente a la acidosis hipercápnica (20% CO₂) en CC de ratas en HC. A. Curso temporal del efecto del KH7 solo (línea rosa) o junto con SQ 22536 (línea azul). **B.** Resumen del efecto de KH7 y KH7 + SQ-22536, sobre la respuesta del CC a la acidosis hipercápnica y a la hipoxia (C) expresada como cociente de liberación evocada S2/S1. Los valores son medias de 12 CC ± SEM. (*p<0.05; **p<0.01 vs control).

Recientemente se ha descrito que esta droga posee un efecto desacoplante en la mitocondria que no está relacionado con sus acciones sobre la ACs (Di Benedetto et al., 2013). Esto cuestiona su utilidad para caracterizar la participación de la ACs en la cascada de transducción ácida/hipercápnica en nuestra preparación. No podemos concluir si la ACs descrita en las CQCC (Nunes et al., 2013) contribuye o no a la señalización del estímulo ácido, actuando como posible sensor del HCO₃⁻ en

dicha preparación. Tampoco podemos descartar ni afirmar que la ACs esté implicada en la señalización de la hipoxia aguda, aunque los resultados que hemos obtenidos sobre la acumulación de AMPc en CQCC nos llevan a descartar su participación (**Figura R18**).

Seguidamente hemos analizado la posible participación de la PKA en la respuesta del CC evocada por el estímulo ácido, al ser una posible diana del aumento de AMPc. Como puede observarse en el curso temporal mostrado en la **Figura R31A**, la aplicación de 1 μ M de H89 no produce ningún efecto en la actividad del CC mientras que la aplicación de 10 μ M de H89 potencia la respuesta secretora basal e inducida por el estímulo ácido, de forma similar a como ocurre con la respuesta a la hipoxia (ver **Figura R21**). En primer lugar, nos llamó la atención este efecto del H89 sobre la activación del CC. Dado que en miocitos de la vena porta de conejo se ha descrito que la actividad de la PKA constitutiva tiene efecto inhibitorio en la actividad SOCC manteniendo dichos canales cerrados y la estimulación de los receptores β -adrenérgicos inhibe la actividad SOCC a través de PKA, quisimos chequear si el efecto del H89 podía deberse a la desinhibición de la entrada capacitativa de Ca²⁺ tal y como se ha descrito en otras preparaciones (Liu et al., 2005), o a través de VOCC. Utilizamos conjuntamente el H89 con un inhibidor de la entrada capacitativa de Ca²⁺ (2-aminoeoxidifenil borato, 2-APB) y un inhibidor de los VOCC (nifedipina). Como puede observarse en la **Gráfica 31**, la aplicación de estas drogas junto con el H89 (10 μ M) no revierte ni parcial ni totalmente el efecto del H89, lo que nos llevó a descartar esta hipótesis. Finalmente, en la **Fig. 31C**, se muestran los efectos del activador de PKA (6Bnz-cAMP), del inhibidor de Epac (BFA) y del activador de Epac (8pCPT-2'-O- Me-cAMP) junto con SQ-22536 sobre la respuesta inducida por acidosis hipercápnica, expresado como cociente S2/S1. Estos datos que solo son reproducibles en CC de ratas expuestas a HC y no en CC normóxicos, son similares a los obtenidos cuando el estímulo aplicado es hipoxia, excepto por la ausencia de efecto de la BFA. En conjunto ponen de manifiesto, que durante la exposición a HC, en los CC de rata aumenta la producción basal de AMPc y la vía de señalización de este segundo mensajero parece cobrar mayor importancia. No se llegaron a probar los inhibidores de nueva síntesis por sus efectos tóxicos sobre la secreción basal.

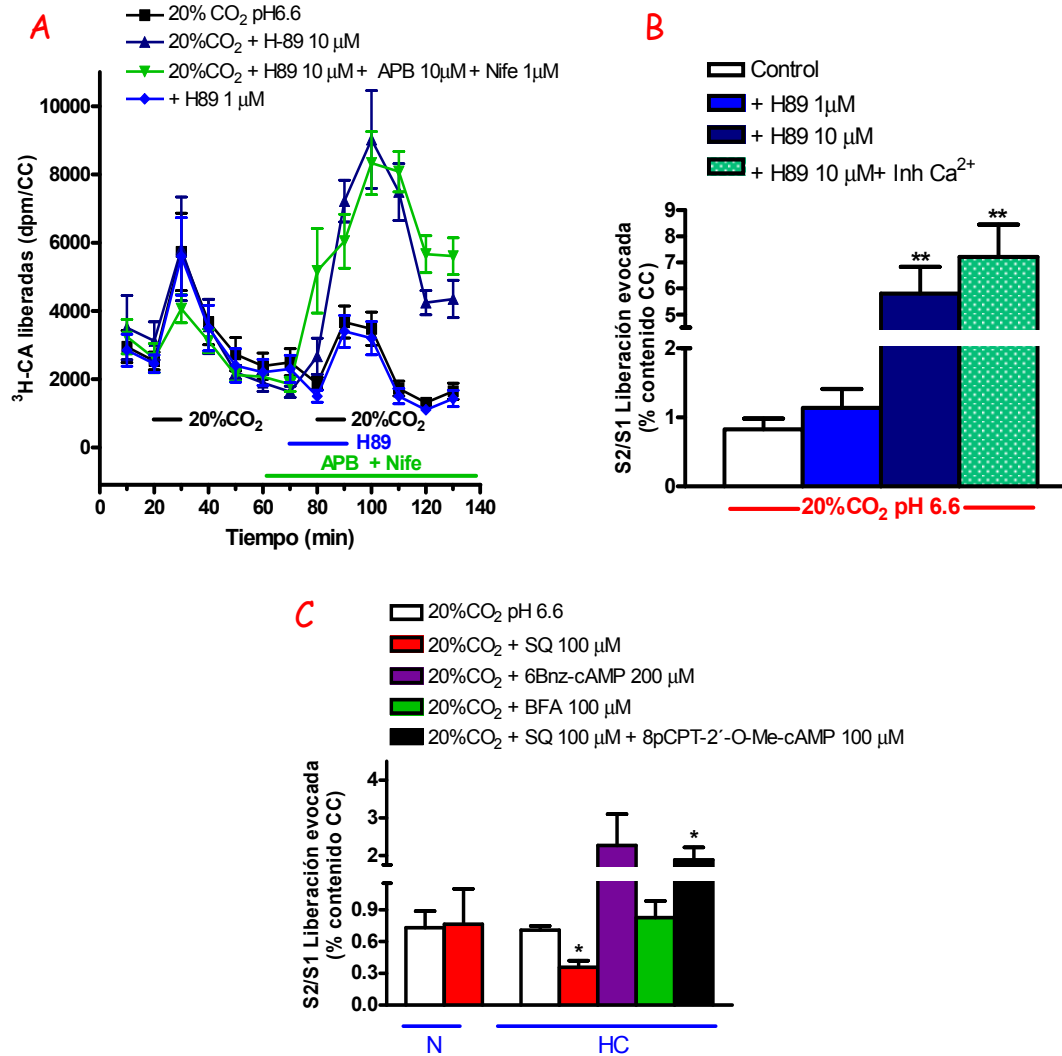


Figura R31. Efecto de la inhibición de la PKA y del Epac sobre la respuesta de las CQCC al estímulo ácido/hipercápnico (20% CO₂ pH 6.6). A. Efecto del inhibidor de la PKA (H89 1 y 10 μM) aplicado por separado o junto con Nifedipina (bloqueante de canales de Ca²⁺ tipo L) y 2-APB (inhibidor de la entrada capacitativa de Ca²⁺). B. Resumen del efecto de H89 expresado como cociente S2/S1 junto con Nifedipina y 2-APB sobre la respuesta del CC de ratas en HC a la acidosis hipercápnica (12 CC ± SEM ** p<0.01 vs control). C. Efecto del activador de PKA, 6Bnz-cAMP, del inhibidor de Epac, BFA, y del activador de Epac + SQ-22536 sobre la respuesta secretora inducida por el estímulo ácido hipercápnico en CC HC. * p<0.05 vs 20% CO₂ pH 6.6; 12 CC ± SEM.

6.8 ESTUDIO DE LA POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA DEL CC A LA HIPOXIA Y ACIDOSIS HIPERCÁPNICA EN EL CC

Desde hace tiempo se conoce que en la génesis de la actividad quimiorreceptora medida tanto a nivel del NSC o de la ventilación, existe una

interacción positiva entre el estímulo hipóxico e hipercápnico de tal forma que la respuesta a ambos estímulos combinados es aditiva o más que aditiva en un amplio rango de niveles de estimulación hipóxica, produciendo las hipoxias más severas respuestas máximas independientemente de la intensidad de la estimulación ácida (Fitzgerald y Parks, 1971; Lahiri y Delaney, 1975; Fitzgerald, 1976; Pepper et al., 1995). Se cree que esta interacción sucede a nivel de las CQ ya que en las células PC12 de feocromocitoma (Taylor et al., 1999) y en las de médula adrenal neonatal (Rico et al., 2005), la estimulación ácida e hipóxica actúan sinérgicamente promoviendo la secreción de CA; en CQ aisladas la hipoxia y el estímulo ácido son también sinérgicos promoviendo aumentos de los niveles de Ca^{2+} intracelular (Dasso et al., 2000). Sin embargo, no se conoce si dicha interacción ocurre también a nivel de secreción de NT o en etapas más tempranas de la cascada de transducción. Por esta razón hemos explorado con técnicas electrofisiológicas y neuroquímicas la relación entre ambos estímulos a nivel de la respuesta eléctrica (Em) y secretora en las CQ. Las medidas electrofisiológicas se han realizado en colaboración con la Dra. Almaraz del Instituto de Neurociencias de Alicante.

La **Figura R32A** muestra el curso temporal de la liberación de CA promovida por los estímulos individuales en 3 grupos de CC en una primera aplicación del estímulo (7% O_2 en dos grupos y 20% CO_2 /20% O_2 en el tercero); durante el segundo estímulo, dos de los tres grupos recibió de nuevo estímulos por separado, pero al tercer grupo se le aplicó simultáneamente un estímulo ácido/hipercápnico e hipóxico (línea discontinua verde), observándose que la respuesta es más que aditiva. La cuantificación precisa de la interacción se muestra en la **Figura R32D** donde se observa una liberación de 0.7% del contenido de CA para el estímulo ácido, 3.2% para el estímulo hipóxico y 5.8% para ambos estímulos combinados. La **Figura R32B** muestra los cambios en el Em de una CQ en cultivo, durante la exposición al estímulo ácido (20% CO_2 , pH 6.6), hipoxia (PO_2 25 mm de Hg) o los dos combinados. La **Figura R32C** muestra los cambios medios del Em (ΔEm) a partir de 6-8 células expuestas a los citados estímulos. Como puede observarse hay un efecto ligeramente mayor que aditivo también a nivel del Em.

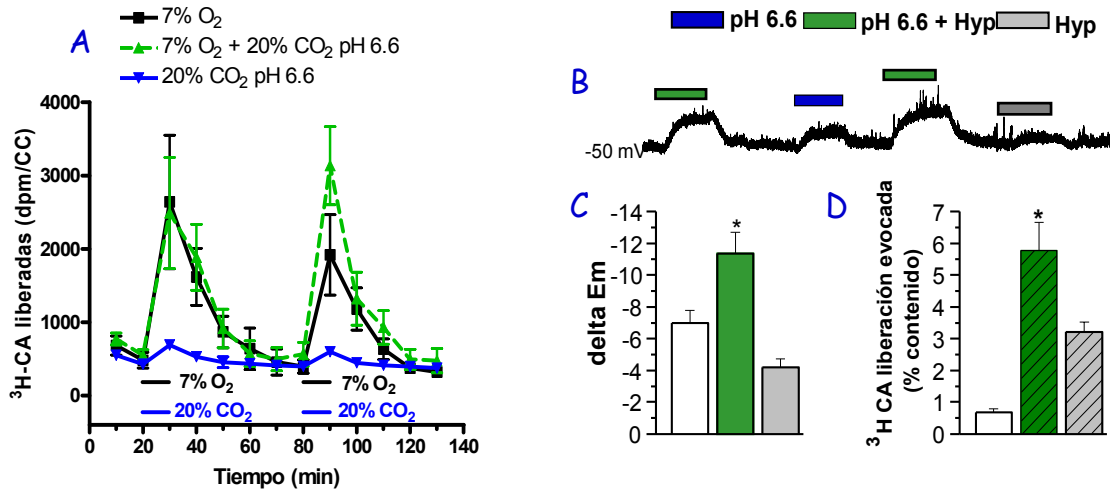


Figura R32. Sinergismo entre acidosis e hipoxia a nivel de las CQCC. **A.** Curso temporal de la liberación de ³H-CA de 3 grupos de CC: primer grupo estimulado 2 veces con hipoxia (7% O₂; línea negra, PO₂=46 mm Hg), el segundo estimulado dos veces con acidosis hipercápnica (20% CO₂ pH 6.6; línea azul); el tercero estimulado inicialmente con hipoxia, y con hipoxia + hipercapnia (línea discontinua verde) durante el segundo estímulo. **B.** Registro del ΔEm de una CQ cultivada tras su exposición a soluciones ácidas hipercápnicas (20% CO₂ pH 6.6), hipóxicas (hipoxia, PO₂= 25-30 mmHg) e hipóxicas/ácidas (Hyp + pH 6.6). **C.** Medias ± SEM de los cambios observados en el Em de 6-8 células expuestas a los estímulos indicados. **D.** Liberación evocada expresada como % del contenido de ³H-CA en el CC antes de la aplicación de los estímulos descritos en A (Media ± SEM, n=12; * p<0.01).

6.9 PARTICIPACIÓN DE AMP_c Y EPAC EN LA POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA DEL CC A LA HIPOXIA Y ACIDOSIS HIPERCÁPNICA

A lo largo de este Trabajo de Tesis Doctoral hemos demostrado la implicación de la vía del AMP_c/Epac en varios mecanismos de señalización tanto en CC normóxicos como hipóxicos crónicos. En este punto nos hemos propuesto probar la hipótesis de que la vía de señalización mediada por AMP_c-Epac podría participar también en la respuesta sinérgica de las CQ al estímulo ácido e hipóxico combinado. La **Figura R33A** muestra que la interacción positiva entre la hipoxia (7% O₂) y la acidosis hipercápnica (20% CO₂, pH 6.6) está, en efecto, mediada por AMP_c ya que la inhibición de la AC elimina totalmente la potenciación de la liberación de CA cuando el SQ-22536 se aplica 10 min. antes y durante el segundo periodo de estimulación. La **Figura R33B** muestra el resumen de los experimentos expresado como cociente de la liberación evocada en el segundo respecto al primer

estímulo; la tercera columna muestra la reversión del efecto potenciador en presencia del inhibidor de AC. La cuarta columna incluye el efecto del activador de Epac, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, sobre los niveles de AMPc inhibidos.

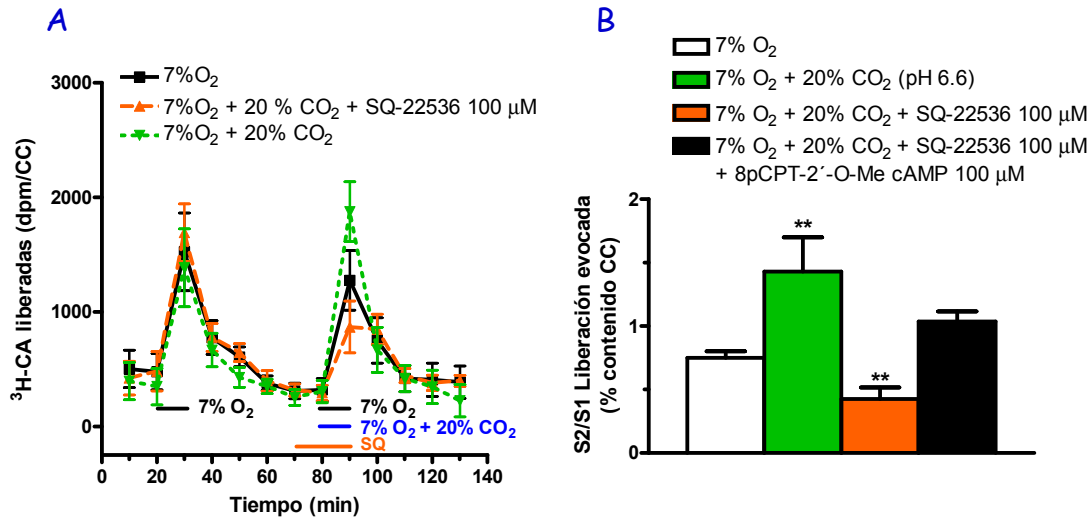


Figura R33. Implicación de AMPc/Epac en la potenciación de la respuesta secretora a la hipoxia/acidosis hipercápnica. A. Curso temporal de la liberación de ³H-CA inducida por dos estímulos consecutivos en tres grupos de CC: hipoxia (7% O₂) en ambos estímulos (línea continua; n=6), hipoxia + hipercapnia (7% O₂ + 20% CO₂, pH 6.6; línea punteada verde), e hipoxia + acidosis hipercápnica en presencia de SQ-22536 (línea discontinua roja) durante el segundo estímulo. B. Resumen del efecto del SQ-22536 sobre el efecto sinérgico de ambos estímulos combinados y su reversión por 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, expresado como cociente S2/S1 de la liberación evocada de ³H-CA (n=8; **p<0.01).

En conjunto, todos estos datos nos llevan a concluir que hay una interacción positiva entre la hipoxia y el estímulo ácido/hipercápnico a nivel de la despolarización de la membrana y a nivel de la respuesta secretora en las CQ. Esta última interacción esta mediada por una vía de señalización dependiente de AMPc-Epac.

Discusión

Aunque este trabajo tiene dos partes bien diferenciadas ambas guardan relación con la cascada de señalización implicada en la respuesta celular a la hipoxia. La primera constituye un estudio detallado de los efectos de la **hiperoxia perinatal** sobre la función de dos tipos de células con sensibilidad a la hipoxia fisiológica: las CMLAP y las CQCC. El objetivo principal fue estudiar la respuesta vasoconstrictora desencadenada por las CMLAP en el estado adulto de estos animales tras la exposición hipóxica aguda, así como analizar el estado redox general de los mismos y el efecto de una dieta suplementada con antioxidantes sobre dichas respuestas. Por otro lado también se estudiaron los efectos de la suplementación sobre la funcionalidad de las CQCC y su control sobre la ventilación. La segunda parte de este trabajo es un estudio de los efectos de la exposición a **hipoxia crónica** centrándonos en la funcionalidad de las CQCC y analizando la participación del AMPc en los cambios funcionales observados, caracterizando las vías de sus principales dianas: PKA y Epac, así como su participación en la respuesta secretora del CC desencadenada por hipoxia y acidosis hipercápnica. Por último también se analizó la implicación de la vía de señalización del AMPc-Epac en la potenciación de la respuesta del CC ante la exposición simultánea a hipoxia y a acidosis hipercápnica. Se demuestra la participación de las proteínas Epac en la cascada de transducción hipóxica, hipercápnica/ácida y en la de ambos estímulos aplicados simultáneamente.

En la Discusión que sigue analizaremos las distintas observaciones experimentales que hemos hecho y sus posibles mecanismos y significado, para concluir con algunas consideraciones concretas relacionadas con ambos modelos experimentales.

1. EFECTOS DE LA HIPEROXIA PERINATAL

Una de las primeras observaciones de este estudio ratifica y amplía los datos previos de Prieto Lloret (2005, Tesis Doctoral). Nuestros resultados muestran que la hiperoxia perinatal no altera ni la frecuencia respiratoria, ni el volumen corriente en la ventilación basal ni en la respuesta ventilatoria a test de hipoxia o hipercapnia en el animal adulto. Estos resultados están en consonancia con los estudios de Darger y cols. (2003) y Wenninger y cols. (2006). Sin embargo, otros autores han

encontrado diferencias, como Ling y cols. (1998) que describieron una disminución marcada en la respuesta a la hipoxia a los 4 meses de edad, recuperando dicha respuesta a los 14 meses de edad de los animales hiperóxicos perinatales. Por el contrario otros laboratorios (Fuller et al., 2002; Bavis et al., 2013) sostienen que esta pérdida de la respuesta a la hipoxia es permanente y que no se recupera. Nuestros datos en conjunto avalan resultados previos y muestran que a pesar de que las funciones de los CC en los animales hiperóxicos estén disminuidas (capacidad disminuida para sintetizar y liberar CA durante la hipoxia) la redundancia de la actividad quimiorreceptora que alcanza el tronco cerebral (ver Prieto-Lloret et al., 2004 para una discusión más amplia) es capaz de mantener la ventilación basal e hipóxica (**Figura R2**). Adicionalmente, la capacidad normal de los animales para responder a la hipercapnia (una respuesta mediada aproximadamente en un 60-70% por los quimiorreceptores centrales; ver González et al., 1994) podría indicar que los mecanismos centrales que controlan la respiración no están afectados por la exposición hiperóxica.

Respecto a la respuesta del CC de las ratas expuestas a hiperoxia perinatal, la liberación de ^3H -CA en respuesta a la hipoxia (**Figura R3**) observada fue esencialmente superponible a la observada por Prieto Lloret: en los CC de animales hiperóxicos hay una fuerte disminución de la liberación evocada por la hipoxia sin afectación de la respuesta evocada por alto K^+ . Esto indicaría que el daño molecular producido por la hiperoxia en las CQCC ha de localizarse en una etapa previa a la despolarización y a la entrada de Ca^{2+} . En la tesis de Prieto Lloret, se ha mostrado, y nuestros datos corroboran, que los CC de los animales hiperóxicos contienen altas concentración de CA endógenas y se caracterizan por una baja síntesis de ^3H -CA y escasa liberación frente a estímulos hipóxicos, implicando una utilización lenta de las CA por las CQ. Prieto-Lloret y cols. (2004) y Kim y cols. (2013), han interpretado estos hallazgos como que sólo sobrevive un porcentaje pequeño de CQ (atrofia de los CC) respondiendo las que lo hacen de forma inadecuada (respuesta secretora y cinética del aumento de Ca^{2+} producido por la hipoxia anómalas). Dado que las respuestas a alto K^+ son normales, el daño molecular

producido por la hiperoxia ocurriría en una etapa de la cascada de transducción previa a la despolarización celular.

Datos previos de nuestro grupo estudiando el efecto de la hipoxia aguda sobre la presión pulmonar registrada en una preparación de pulmón aislado *in situ* (Prieto Lloret, Tesis Doctoral, 2005) indicaban que la hiperoxia perinatal produce una pérdida permanente y casi total (81%) de la VPH. Los experimentos realizados en este trabajo en animal anestesiado intacto (**Figura R4**) verifican los datos de Prieto Lloret y muestran que el Δ PAP inducido por la hipoxia en los animales hiperóxicos (**Tabla R1**) representa una disminución de la respuesta hipóxica del 86% con respecto a los animales controles.

Según resumimos en la Introducción la hipoxia hipóxica de baja intensidad aumenta la contractilidad cardiaca, pero a hipoxias más intensas se produce un efecto inotrópico negativo, con vasodilatación a todos los niveles, excepto a nivel pulmonar donde aparece vasoconstricción. La suma de todos los mecanismos conduce a taquicardia, aumento del gasto cardiaco y vasodilatación periférica. Con hipoxia sostenida, el aumento del reflejo quimiorreceptor (aclimatación) disminuye la taquicardia y normaliza el gasto cardiaco frente al consumo total de O₂. Por tanto, la interpretación de nuestros hallazgos en animal anestesiado requiere la consideración de los efectos sistémicos de la hipoxia. Dado que la hipoxia produce vasodilatación e hipotensión sistémicas y que la VPH registrada en animal intacto se ve atenuada, ¿podrían ser atribuibles estas diferencias encontradas en la VPH entre animales controles e hiperóxicos perinatales a efectos sistémicos, es decir a una vasodilatación sistémica exagerada que redujera el gasto cardiaco de forma exagerada? Para poder excluir o no esta posibilidad, medimos de forma simultánea la PA sistémica y la VPH tanto en animales controles como hiperóxicos perinatales. Los datos que se muestran en la **Tabla RI** ratifican el efecto hipotensor sistémico de la hipoxia, pero excluyen que exista una hipotensión sistémica exagerada en los animales sometidos a hiperoxia perinatal, que sea la responsable de las diferencias con respecto al grupo control, ya que los valores obtenidos son del mismo rango en ambos grupos de animales. De hecho, la hipotensión sistémica en el grupo hiperóxico es menor, descartando como hemos dicho que sea la responsable de la

casi total pérdida de la VPH. En su conjunto, pues, los registros de la VPH y de la PA sistémica ratifican el efecto obtenido en la preparación aislada *in situ* e indican que la exposición perinatal a una atmósfera hiperóxica produce la pérdida permanente de la capacidad de las AP para responder a la hipoxia. Finalmente queremos señalar que los datos obtenidos en nuestro estudio indican que el modelo experimental es reproducible, al menos en lo que hace referencia a la funcionalidad del CC y de los vasos pulmonares.

Tradicionalmente la hiperoxia se relaciona con daño oxidativo mediante un aumento de los niveles de ROS, en particular O_2^- (Halliwell y Gutteridge, 2007). Aunque algunos autores midiendo proteínas carboniladas en plasma no han encontrado diferencias significativas en los animales sometidos a hiperoxia y la suplementación dietética con vitamina E o el mimético de superóxido dismutasa manganeso III, (MnTMPyP), no revierte las alteraciones inducidas por la hiperoxia en el CC (Bavis et al., 2008), nosotros decidimos comprobar alguno de estos aspectos midiendo los niveles de GSH y GSSG. Schafer y Buettner (2001), han señalado que el estado redox del par GSSG/2GSH es un indicador importante del ambiente redox celular, ya que su concentración es muy alta en comparación con la de los demás pares redox. Estos autores también indican que los cambios en el potencial redox calculados a través de la ecuación de Nernst, así como la capacidad reductora (concentración de la especie reducida del par, GSH) son factores principales en la determinación del estado biológico de la célula (apoptosis, diferenciación...). Nuestros resultados sobre el potencial redox mostrados en la **Figura R5** demuestran que el E_{GSH} está disminuido de forma significativa en pulmón e hígado siendo normal en cerebro. A 90 días, sin embargo, los animales tenían valores normales de GSH, GSSG y E_{GSH} . Estos datos indican que hay estrés oxidativo durante la primera semana de vida en estos animales sometidos a hiperoxia perinatal, en pulmón e hígado, mostrando el cerebro un comportamiento específico y una aparente protección especial frente al daño hiperóxico. Posteriormente, al alcanzar el animal el estado adulto, deben de existir mecanismos compensatorios que hacen que dicho estado oxidativo desaparezca.

La expresión de la GPx es potencialmente regulable por los niveles de ROS (ver Halliwell y Gutteridge, 2007; Quintero et al., 2013), pero tal y como se observa

en la **Figura R6**, la exposición perinatal a hiperoxia no modifica los niveles de actividad de la enzima en ninguna de los tejidos estudiados. Parece, por tanto, que la expresión de GPx no se induce en situación de hiperoxia, tal y como ocurre en otras situaciones de daño oxidativo (ver Quintero et al., 2013 para referencias). Puesto que existen múltiples vías interconectadas para detoxificar y eliminar las ROS dentro de la célula (Sen, 1998; Moini et al., 2002; Rochette et al., 2013), podemos sugerir la implicación de varias de ellas por otros mecanismos que no alteren la expresión enzimática de la GPx.

La existencia de un estado de estrés oxidativo en los animales hiperóxicos a los 7 días de edad, nos llevó a realizar un nuevo grupo de experimentos con animales sometidos al mismo tratamiento hiperóxico pero suplementados con dieta antioxidante (ácido lipoico y vitamina E) durante el tiempo que duraba la exposición hiperóxica. Aunque la medida de α -tocoferol en plasma mostró que la hiperoxia no alteraba dichos niveles y que la dieta antioxidante tampoco lo hacía, los datos mostrados en la **Figura R8**, nos indican que la suplementación fue eficaz a la hora de corregir la disminución del E_{GSH} en pulmón e hígado a los 7 días, sin modificar sustancialmente los niveles totales de glutatión. El cerebro, como ya hemos comentado, posee un comportamiento específico y la suplementación produjo un cambio oxidativo permanente tanto a los 7 como a los 90 días. Cabría preguntarse porqué este órgano posee un comportamiento especial. Tal y como algunos grupos han señalado (Stvolinsky et al., 1999; Rajanikant et al., 2007), podría deberse a una mayor concentración de carnosina, que es un dipéptido endógeno que se expresa de forma mayoritaria en cerebro y corazón y posee un comportamiento neuroprotector frente al daño isquémico-oxidativo típicamente producido por un aumento de las ROS en el proceso hipoxia-reoxigenación.

Una vez encontrados los efectos favorables de la aplicación de una dieta antioxidante en los animales sometidos a hiperoxia perinatal sobre el E_{GSH} en pulmón e hígado en etapas iniciales de la vida de los animales, estudiamos si este tratamiento era capaz de corregir o restituir de algún modo las alteraciones funcionales producidas por la hiperoxia en la circulación pulmonar (VPH) y en el

CC. El análisis de las respuestas ventilatorias (**Tabla RII**) mostró que salvo una pequeña excepción para la hipoxia del 12% de O₂, la suplementación no modificaba de forma significativa los parámetros ventilatorios obtenidos en los animales hiperóxicos suplementados con respecto a los otros grupos experimentales. A su vez, la pérdida de respuesta del CC a estímulos hipóxicos, pero no a los estímulos despolarizantes inespecíficos (**Figura R10A**) no se recuperaba tras la suplementación con antioxidantes. Este hecho junto con la normalidad de la respuesta ventilatoria (**Tabla RII**), nos lleva a concluir que la ventilación en normoxia y en hipoxia se mantienen merced a la redundancia de la información que desde el CC llega al tronco del encéfalo.

Otra observación realizada hace referencia al papel del AMPc en el CC de animales controles, en los que aumenta por un factor de ≈ 3 al aplicar un estímulo hipóxico del 7% O₂ (ver también Pérez-García et al., 1990). En animales hiperóxicos se pierde esta respuesta y la dieta antioxidante no revierte el efecto de la hiperoxia perinatal (**Figura R10**). Estos hallazgos implican que tanto la regulación aguda de la función de las CQCC como la regulación a largo plazo de la expresión génica mediada por AMPc (vía CREB; Lim et al., 2000) se habrían perdido en los animales hiperóxicos. Dado que el AMPc aumenta la liberación de catecolaminas del CC en respuesta a la hipoxia sin afectar a la liberación inducida por la aplicación de alto K⁺_e (Pérez-García et al., 1991), y dado que la hiperoxia disminuye la liberación inducida por la hipoxia sin afectar la liberación inducida por alto K⁺_e, pensamos que ambas observaciones están causalmente relacionadas: la incapacidad de las CQ para liberar CA en respuesta a la hipoxia en animales hiperóxicos podría deberse a su imposibilidad para generar AMPc. En este mismo sentido apuntan datos recientemente obtenidos en nuestro laboratorio en el CC de cobaya: la hipoxia no induce respuesta secretora en el CC de cobaya ni tampoco aumenta los niveles de AMPc frente a estímulos hipóxicos. En términos operativos y como propuesta de futuros experimentos consideramos que de las múltiples adenilato ciclasas de membrana, puede existir una isoforma que sea regulada por hipoxia de forma aguda cuya expresión o función estaría reprimida por la hiperoxia y quizás en CC de especies animales insensibles a la hipoxia.

El estudio de la VPH en los animales hiperóxicos con dieta suplementada (**Tabla RIIIA**), nos llevó a uno de los descubrimientos más novedosos e importantes del presente trabajo: aunque la hiperoxia perinatal provoca una pérdida permanente de la VPH, asociada con un estado oxidativo temprano en el pulmón, la dieta rica en antioxidantes durante la exposición a hiperoxia revierte ambos parámetros, el estado redox y la VPH. La recuperación de la VPH fue independiente de los efectos sistémicos de la hipoxia aguda (**Tabla RIIIB**).

En conjunto, nuestros datos sugieren que la exposición hiperóxica abole la expresión de algunos elementos de la cascada de transducción hipóxica indispensables para que se desarrolle la VPH. Como en el caso de las CQCC (Prieto-Lloret et al., 2004; Kim et al., 2013), los datos de las **Figuras R3 a R10** (con la excepción de **R7, esquema**) indican que el elemento no expresado en las CMLAP de los animales hiperóxicos está *upstream* de la despolarización y de la entrada de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} operados por voltaje. Los estudios previos de Prieto Lloret utilizando 4-AP (un agente despolarizante que inhibe las corrientes Kv , conduciendo a la despolarización celular y a la activación de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje, entrada de Ca^{2+} y activación de la contracción; Olschewski et al., 2002; Cogolludo et al., 2005) mostraban que esta droga generaba un incremento en la PAP que era casi idéntico en las ratas controles e hiperóxicas. Si los canales de Ca^{2+} operados por voltaje y la maquinaria contráctil funcionan con normalidad, cabría preguntarse si las corrientes de K^+ sensibles a la hipoxia que poseen las CMLAP se mantenían o no en los animales hiperóxicos cuya respuesta de VPH estaba abolida. Para contestar dicha pregunta se realizaron medidas electrofisiológicas en CMLAP aisladas de estos animales. Como muestran las **Figuras R11 y R12** no se observan cambios en ninguno de los parámetros medidos (E_m , C_m y relación densidad de corriente de K^+ - E_m) señalando también que los componentes de las corrientes de K^+ sensibles a O_2 son comparables en CMLAP controles y en CMLAP de animales hiperóxicos (**Figura R12**). A su vez, los experimentos sobre la producción de O_2^- en arterias de resistencia desnudas de endotelio de animales controles e hiperóxicos utilizando DHE (**Figura R13**), muestran que tampoco hay diferencias en la producción de ROS. Estos hechos nos

llevarían a la conclusión de que si las corrientes de K^+ y la producción de ROS son condiciones necesarias no son condiciones suficientes para disparar la VPH.

Todos los resultados concernientes a esta parte nos llevan a preguntarnos cuál es el elemento dañado tras el tratamiento hiperóxico perinatal y la respuesta a la que llegamos es que por el momento no se conoce. Sin embargo, podemos hacer algunas consideraciones basadas en la literatura actual que nos permiten aproximarnos a los mecanismos implicados. Como ya se ha mencionado, una primera consideración es que la presencia de corrientes de K^+ sensibles a O_2 pueda ser un elemento necesario pero no suficiente para generar de un modo completo la VPH. Sylvester et al. (2012) tratarían esto de diferente manera: puesto que los canales Kv están diseñados para oponerse a la despolarización causada por otros canales, la inhibición hipóxica de IK^+ puede permitir, más que provocar, que tenga lugar la despolarización hipóxica. Por otra parte, Plathosyn et al. (2006) han mostrado que Kv1.5, que se expresa en células de músculo liso de AP y mesentéricas, está inhibido por la hipoxia sólo en las CMLAP, llevándoles a la conclusión de que las propiedades como sensor de O_2 no residen en la entidad molecular del canal, sino que podría ser una propiedad específica del medio celular, o en otras palabras, podría depender de un sensor de O_2 expresado específicamente en las CMLAP, tal y como parece ser el caso en las CQCC (ver González et al., 2009). Aparte de las similitudes (corrientes de K^+ sensibles a hipoxia, respuestas calcio dependientes, bajo umbral hipóxico,...), la maquinaria de transducción hipóxica en las CQCC y en las CMLAP es diferente en otros aspectos. Por ejemplo, mientras que los depósitos intracelulares de Ca^{2+} no participan en la génesis de las respuestas en las CQCC frente al estímulo hipóxico (Buckler y Vaughan-Jones, 1994 a; Vicario et al., 2000 b), la rianodina (una droga capaz de vaciar los depósitos intracelulares de Ca^{2+} al unirse a los receptores de IP_3) inhibe los aumentos en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por la hipoxia así como la contracción en arterias aisladas y respuestas presoras en pulmones aislados, aunque no siempre de una forma completa (ver Sylvester et al., 2012). El vaciado de los depósitos con caféina aumenta aun más la inhibición de la tensión desencadenada por la hipoxia (alrededor de un 80%), en varias especies, llevando a la conclusión de que la

hipoxia libera el Ca^{2+}_i de los depósitos sensibles a rianodina por un mecanismo intrínseco a la musculatura lisa de los vasos pulmonares sin la necesidad de un flujo de entrada de Ca^{2+} (Dipp et al., 2001; Dipp y Evans, 2001). Curiosamente, la señal de Ca^{2+}_i desencadenada por la hipoxia en soluciones carentes de Ca^{2+} consiste en un pico de Ca^{2+} transitorio con pérdida de la respuesta mayor y otro de tipo estacionario y la abolición de la VPH o su reducción a una pequeña contracción transitoria (Dipp et al., 2001; Wang et al., 2005). Por otro lado, la expresión preferente en las arterias de resistencia del complejo implicado en la entrada de Ca^{2+} operada por depósitos (STIM1 y ORAI-1), y el hecho de que la supresión de su expresión con siRNA reduzca la respuesta intracelular de Ca^{2+} en las CMLAP a una pequeña corriente transitoria similar a la observada en ausencia de Ca^{2+} (Lu et al., 2009; Ng et al., 2010) ha llevado a proponer un papel crucial para el(los) canal(es) Ca^{2+} operados por depósitos en el aumento de Ca^{2+} intracelular de tipo sostenido y en la VPH (ver Sylvester et al., 2012). Por lo tanto, la pregunta se mantiene ¿qué es lo que daña la exposición hiperóxica para que se produzca la casi total eliminación de la VPH? El debate actual nos conduce a vislumbrar dos alternativas diferentes (Figura D1).

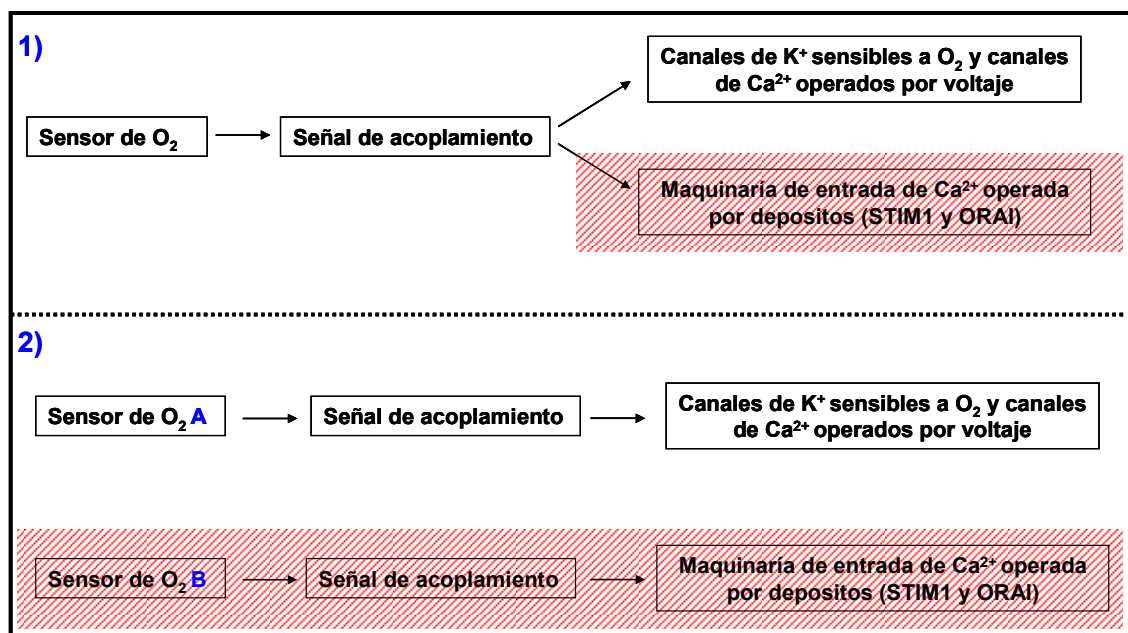


Figura D1. Esquema propuesto del proceso de transducción hipóxica en las CMLAP que desencadena la VPH.

1) Existe en las CMLAP una única señal que emana del sensor de O_2 y que se manifiesta de una forma divergente hacia los canales de K^+ sensibles a O_2 y hacia la maquinaria de liberación de los depósitos de Ca^{2+} . 2) Hay dos vías independientes de señalización: dos sensores de O_2 con vías paralelas, una hacia los canales de K^+ sensibles a O_2 y los canales de Ca^{2+} operados por voltaje que parecen no estar afectados por la exposición hiperóxica, y la otra vía de señalización hacia la maquinaria de liberación del Ca^{2+} de los depósitos.

Sea como fueren las cosas parece evidente que el sensor de O_2 , o las vías de acoplamiento o entrada de Ca^{2+} operada por voltaje, son elementos potencialmente alterados. Es importante esta consideración porque la expresión de STIM1 y ORAI (u otras isoformas) es medible y puede constituir un objetivo directo de futuras investigaciones. En cualquier caso parece que hay un silenciamiento epigenético inducido por el estrés oxidativo provocado por la hiperoxia (ej. Nanduri et al., 2012; Patterson et al., 2012; Hayes y Knaus, 2013), y lo más importante es que cualquiera que sea la identidad del gen silenciado, el silenciamiento es revertido por el tratamiento antioxidante (**Figura R8** y **Tabla RIII**) lo que ayudaría a identificar el factor perdido o dañado.

Desde un punto de vista clínico, nuestros datos apuntan hacia la recomendación de asociar la terapia con O_2 en neonatos con una administración juiciosa de antioxidantes. Adicionalmente, recomendaríamos que cuando se haga frente a enfermedades pulmonares o cirugía torácica (ver Introducción), la historia médica debe ser meticulosa en cuanto a lo que se refiere a una posible administración previa de O_2 en el periodo perinatal.

2. EFECTOS DE LA HIPOXIA CRÓNICA

La segunda parte de esta Tesis Doctoral muestra los efectos de la hipoxia crónica en la funcionalidad de las CQCC, centrándonos principalmente en la participación de la vía AC-AMPC-Epac y su posible implicación en la respuesta adaptativa del CC a la HC o a aclimatación a grandes alturas.

Los periodos prolongados de hipoxia inducen múltiples respuestas celulares (Bunn y Poyton, 1996) como consecuencia de una disponibilidad reducida de O₂. Respuestas comparables se producen en enfermedades que cursan con hipoxia prolongada: EPOC, insuficiencia cardiaca congestiva o la apnea del sueño como patología asociada a la HI. La exposición a HC provoca la hipertrofia de los CC de ratas con un aumento del 80% de su peso y un incremento de su tamaño y de su vascularización. También se produce un aumento proporcional de β actina y una inducción de la enzima TH de 3 veces (Cáceres, 2007, Tesis Doctoral).

La hipoxia, mediante la interacción con el sensor de O₂ y a través de la cascada de transducción sobre distintos efectores induce genes, factores de transcripción, canales iónicos, transportadores y enzimas, dando lugar a una remodelación adaptativa encaminada a restaurar el funcionamiento normal del organismo en situaciones de baja disponibilidad de O₂. En la **Figura D2** se muestra un esquema del proceso de aclimatación en el ser humano tras la exposición a hipoxias prolongadas, señalando con una línea discontinua la ventilación basal a nivel del mar. También se muestran las situaciones asociadas con la HC, así como los distintos factores que contribuyen al remodelado.

Los cambios morfológicos del CC parecen traducirse en modificaciones en la actividad del CC. La exposición a HC (**Fig. R14**) muestra que las ratas sometidas a hipoxias del 10-11% O₂ durante 7 días hiperventilan más que las controles cuando se les aplican hipoxias agudas de distinta intensidad e hipercapnia. Este aumento de la ventilación se debe a un incremento en el volumen corriente respecto a los animales controles, sin variaciones en la frecuencia respiratoria. Como la hiperventilación producida por la hipoxia está mediada exclusivamente por los quimiorreceptores arteriales (el CC mayoritariamente), podemos deducir que se produce una hiperfuncionalidad y sensibilización en los CC de las ratas sometidas a HC. Estos datos verifican estudios previos y corroboran que el protocolo experimental que hemos aplicado para el estudio de la aclimatación de las ratas a la HC es el adecuado.

ACLIMATACIÓN A HIPOXIA CRÓNICA



SITUACIONES HIPOXIA CRÓNICA:

- Altitud
- Enfermedades cardiorespiratorias:
 - Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
 - Enfermedad Cardíaca Congestiva
 - Apnea del sueño

REMODELADO DEL CC POR HIPOXIA CRÓNICA:

- Hipertrofia del CC
- Aumento de excitabilidad de células tipo I
- Up/Down-regulación de canales iónicos y enzimas

Fig D2. Aclimatación y adaptación de la respuesta hipóxica tras la exposición a HC en humanos y animales de experimentación. Se muestra un aumento de la ventilación como respuesta a una reducción en la PO_2 . En humanos nacidos a nivel del mar (línea punteada) y que ascienden a grandes alturas, la aclimatación permanece durante toda la vida. En animales de experimentación, la aclimatación tiene una duración variable y no siempre está bien establecida, pasando a continuación a una etapa de adaptación o hipofuncionalidad del reflejo quimiorreceptor con un retorno hacia valores basales. En la figura también se describen las situaciones de HC así como los efectos más significativos del remodelado del CC por la HC.

La hipertrofia observada en los CC de animales expuestos a HC se debe en parte al gran aumento de la vascularización en esta situación (Laidler y Kay, 1975; Clarke et al., 2000) con tamaños 3-4 veces superiores *vs* a los de las ratas normóxicas y una coloración rojiza mucho más intensa, estando mediado el efecto por un aumento de expresión durante la hipoxia del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Chen et al., 1998), que a su vez se encuentra regulado por el factor inducible por hipoxia HIF-1 α (Forsythe et al., 1996). En condiciones de normoxia HIF-1 α es hidroxilado por las enzimas prolil hidroxilasas en los residuos de prolina 402/564, lo que conduce a su interacción con la proteína de von Hippel-Lindau (pVHL), promoviendo su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma de HIF-1 (Figura D3). Hay que señalar en este proceso, que realmente la proteína sensora de O_2 no es el factor HIF-1 por sí mismo sino la familia de enzimas prolil hidroxilasas que hidroxilan como hemos visto HIF-1 α en

condiciones de normoxia y favorecen su degradación. En ausencia de O_2 , HIF-1 α se acumula rápidamente y dimeriza con HIF-1 β para poder ser vehiculizado al núcleo y actuar como factor de transcripción, unirse al DNA y facilitar el reclutamiento de cofactores (p300/CBP). La translocación del heterocomplejo HIF-1 al núcleo y su unión a regiones específicas de la región promotora conocidas como elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) conduce a la activación de familias específicas de genes que tienden a restaurar la situación perniciosa provocada por la hipoxia. Entre ellos se encuentra el gen de la EPO (Bunn y Poyton, 1996; Semenza, 2000) que provoca la eritropoyesis típica de los individuos sometidos a HC y el VEGF (Forsythe et al., 1996).

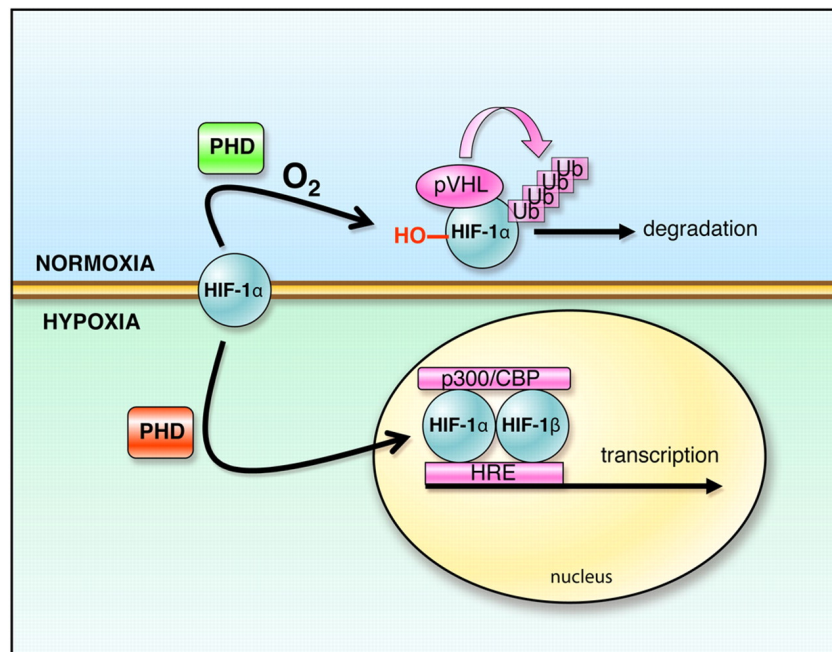


Figura D3. Degradación del Factor inducible por hipoxia (HIF)-1 α en condiciones normóxicas frente a su estabilización con la hipoxia. En la parte superior se muestra lo que sucedería en normoxia: las enzimas prolil hidroxilasas (PHD) en presencia de O_2 hidroxilan HIF-1 α , que de esta forma puede unirse a la proteína de von Hippel Lindau (pVHL). Esta asociación promueve la poliubiquitinación de HIF-1 α y posibilita su posterior degradación en el proteasoma 26-S. En la parte inferior se describe lo que sucedería en una situación hipóxica: la falta de oxígeno previene la hidroxilación de HIF-1 α por las PHD, conduciendo a su estabilización. HIF-1 α en estas condiciones puede migrar al núcleo y asociarse con HIF-1 β y el cofactor p300/CBP. El complejo-HIF-1 se une a la región promotora de genes que contengan elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) induciendo su transcripción, estos genes poseen secuencias centrales 5'-ACGTG-3' en su región promotora. (Tomado de Balligand et al., 2009).

En el CC, uno de los genes que sufre sobreexpresión mediada por HIF es el de la TH implicada en la síntesis de CA (Norris y Millhorn, 1995), lo que junto con

el hecho de que la hipoxia aumenta la estabilidad del RNAm de TH (Czyzyk-Krzeska et al., 1992) hace que ésta pueda ser utilizada como marcador en la HC. HIF regula además la expresión de otros genes implicados en el control vasomotor como la NO sintasa (NOS) (Palmer et al., 1998) o la hemooxigenasa 1 (HO-1) (Lee et al., 1997) y numerosos genes que participan en el metabolismo de la glucosa.

Además de los cambios morfológicos durante la aclimatación a hipoxias prolongadas, también tienen lugar alteraciones neuroquímicas y funcionales. Las células tipo I del CC se vuelven más excitables, aumentando la sensibilidad del órgano a test de hipoxia aguda. Los resultados encontrados sobre la expresión de diferentes canales en el trabajo de Cáceres (Tesis Doctoral, 2007), llevaron a nuestro grupo a proponer un modelo de transducción en el que el aumento en la expresión de canales de K⁺ tipo TASK y de Na⁺, junto con un remodelado en la expresión de las subunidades α y β del maxi-k e inducción de HO-1 constituyen parte del mecanismo por el que aumenta la sensibilidad del CC durante la aclimatación a la HC.

Aunque no se saben los mecanismos por los que ocurren estos procesos de sensibilización a la HC, los experimentos previos del grupo de Nurse (Jackson y Nurse, 1995; Stea et al., 1992, 1995) en CQCC de conejo en cultivo (Stea et al., 1992, 1995) muestran que la HC induce canales de Na⁺ (aumento de la densidad de las corrientes hasta 6 veces por encima de los valores encontrados en normoxia) siendo el efecto reproducido por análogos permeables de AMPc (dibutilil AMPc y N₆,O₂'-dibutililadenosina 3',5'-cíclica) y por FSK. Estos autores proponen que la inducción de canales observada así como el aumento de excitabilidad eléctrica y la movilización de Ca²⁺ en las células tipo I están mediados por AMPc, hecho que ha justificado el punto de partida de esta segunda parte de la Tesis donde se han analizado las implicaciones de la vía AMPc-PKA-Epac en la cascada de transducción hipóxica de las CQCC sometidas a hipoxias sostenidas.

Posteriormente se han visto también remodelaciones en los canales de Ca^{2+} (Hempleman, 1996). Puesto que los canales de Ca^{2+} son elementos clave en la cascada de transducción hipóxica (Obeso et al., 1992; González et al., 2003), hemos verificado si existían modificaciones en dichos canales tras la hipoxia crónica. Trabajos previos del grupo (Rocher et al., 2005) muestran la participación de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes en CQ de CC de conejo de los tipos L y P/Q. Posteriormente en experimentos realizados en CC tras la exposición a HC se comprobó que en tal situación no se modifica la Ca^{2+} dependencia de la secreción, la dependencia de voltaje de la entrada de Ca^{2+} a la célula y la participación exclusiva de canales tipo L en la respuesta a la hipoxia (Cáceres et al., 2009). Además, los datos de RT-PCR mostraron la presencia e inducción de la subunidad $\alpha 1\text{C}$ de los canales de Ca^{2+} tipo L ($\text{Ca}_v1.2$) en CC de ratas hipóxicas crónicas, pero no la de la isoforma $\alpha 1\text{D}$ ($\text{Ca}_v1.3$) (Cáceres et al., 2009). En el presente trabajo hemos comprobado mediante Western Blot tales resultados. Las bandas obtenidas mediante esta técnica se corresponden con el tamaño molecular esperado para la proteína (220 KDa para $\text{Ca}_v1.2$) y la inmunocitoquímica demuestra colocalización de los canales con la TH, pero no se observan diferencias apreciables en los CC de los animales en HC con respecto a los controles. El aumento de expresión a nivel de mensajero y no a nivel de proteína indica desde luego que la hipoxia crónica produce cambios en la cinética de transcripción-transducción-degradación cuyo significado último se nos escapa pero que no justifican por sí mismos el aumento de excitabilidad del CC.

Como ya hemos mencionado reiteradamente, los hallazgos del grupo de Nurse (Stea et al., 1992), *in vitro*, indicaban que la HC induce canales de Na^+ y que el AMPc mimetiza los efectos de la hipoxia. El hecho de que se produzca un aumento de los niveles de AMPc cuando los CC se someten a hipoxia, junto con el hecho de que los agentes que elevan los niveles de AMPc en el CC de conejo aumentan específicamente la liberación de CA inducida por hipoxia (Pérez García et al., 1990, 1991), nos ha llevado a analizar la posibilidad de que la respuesta secretora potenciada en los CC sometidos a HC estuviera también mediada por cambios específicos del AMPc en dichas condiciones y en la activación de sus

principales efectores, la PKA y el Epac. En la **Figura R17** se resumen los efectos de la hipoxia aguda sobre los niveles de AMPc en las ratas normóxicas, en ratas expuestas a HI y en HC. Se observa una potenciación del efecto en el caso de las ratas HI, sugiriendo que el AMPc puede mediar la sensibilización que la HI produce (González Martín et al., 2011). Mientras que para el grupo en HC, los niveles basales de AMPc están ya aumentados y la aplicación a mayores de la hipoxia aguda no produce aumentos adicionales significativos.

Los resultados en CC de animales normóxicos están en consonancia con estudios previos del grupo (Pérez García et al., 1990, 1991; ver también Delpiano y Acker, 1991; Wang et al., 1991). Los experimentos mencionados de Pérez-García et al. (1990) se realizaron tanto en presencia como en ausencia de Ca^{2+} . Los CC incubados en medios con Ca^{2+} al 10% O_2 exhibían un aumento marcado en su contenido de AMPc. A PO_2 de 46 mmHg (7% O_2) el efecto de la hipoxia era máximo, alcanzando valores 7 veces superiores a los tejidos controles incubados a 660 mmHg (**Fig. 20**). En el medio sin Ca^{2+} , los niveles basales de AMPc eran aproximadamente la mitad de los observados en los controles en medios con Ca^{2+} , lo que sugería la existencia de dos componentes en el aumento de AMPc desencadenado por la hipoxia: uno dependiente y otro independiente de Ca^{2+} , de modo que la disminución de la PO_2 parece activar directamente al sistema generador de AMPc (la AC). En el medio que contiene Ca^{2+} hay un aumento adicional que reflejaría la activación de la AC por los NT liberados (Cachero et al., 1996).

Los datos aquí presentados sobre el efecto de los inhibidores de la AC transmembrana (SQ-22536) y soluble (KH7) sobre el aumento de AMPc inducido por la hipoxia aguda (7% O_2) en CC de ratas controles (**Figura R18**) indican que sólo la AC_{tm} participa activamente en el proceso de transducción del estímulo hipóxico, ya que su inhibidor específico abole aproximadamente el 90% del aumento de AMPc inducido por la hipoxia, equiparándolo a los niveles basales, mientras que el inhibidor de la AC_s, no produce ningún efecto, a pesar de que dicha enzima ha sido identificada recientemente en las CQCC (Nunes et al., 2009). Resultados posteriores de este mismo grupo (Nunes et al., 2013) han confirmado

nuestras observaciones y descartan a la ACs como elemento transductor en la cascada de transducción hipóxica en el CC de rata.

A pesar de descartar la participación de la ACs en la cascada de transducción hipóxica hemos evaluado su participación en la cascada de transducción del estímulo ácido ya que se había propuesto como posible sensor para cambios rápidos en la $[\text{HCO}_3^-]$ (Nunes et al., 2009). Los resultados mostrados en la **Figura R19** descartan también esta posibilidad ya que no se aprecian diferencias significativas en ninguna de las condiciones de hipercapnia ácida utilizadas. Ello está en consonancia con los datos de estudios más recientes donde se muestran que la ACs no tiene ningún papel fisiológico significativo en la producción de AMPc en respuesta a la hipercapnia isohídrica en el CC (Nunes et al., 2013). Estos autores encuentran que la expresión relativa del RNAm de la ACs es menor que la de la ACtm, no hay cambios dependientes del tiempo en el AMPc en presencia o ausencia de KH7 variando la $[\text{HCO}_3^-]$ y no hay efecto sobre la actividad de la PKA en presencia de diferentes $[\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2]$. Estudios previos de nuestro laboratorio (Pérez García et al., 1990) muestran un aumento muy leve del AMPc en condiciones de acidosis hipercápnic, siendo además dependiente de la presencia de Ca^{2+} , lo que sugiere que el estímulo ácido no activa la AC directamente sino a través de las acciones de los NT liberados, a diferencia del estímulo hipóxico capaz de aumentar los niveles de AMPc en medios carentes de Ca^{2+} .

Como ya hemos mencionado, el incremento de la acumulación de AMPc inducido por hipoxia en medios carentes de Ca^{2+} es reflejo del aumento de la actividad de la AC localizada en las CQCC, lo que llevó a nuestro grupo a proponer un modelo de transducción del estímulo hipóxico acoplado al sistema AC-AMPc (**Figura 20**) (Cachero et al., 1995, 1996) que complementaba al propuesto inicialmente en CQCC y que todavía está vigente (González et al., 1992, 1994). La baja PO_2 origina una señal sobre el sensor de O_2 inhibiendo la corriente de K^+ y activando la AC. La inhibición de la corriente de K^+ , activa canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje conduciendo a la entrada de Ca^{2+} y al aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. El aumento de Ca^{2+} intracelular activa la maquinaria excitotica y el aumento de los niveles de AMPc modula la corriente de K^+ y la maquinaria

exocitótica haciendo la estimulación hipóxica más efectiva. En resumen el AMPc activaría la cascada de transducción hipóxica al menos en 2 pasos diferentes: 1) inhibiría las corrientes de K⁺ sensibles a O₂ conduciendo a una potenciación del estímulo hipóxico y 2) modularía la maquinaria exocitótica de las CQCC.

Aunque los análogos permeables de AMPc inhiben la corriente de K⁺ sensible a hipoxia (López-López et al., 1993), el nucleótido no es necesario para la inhibición de las corrientes de K⁺ por la hipoxia, ya que como hemos citado, en estudios previos se ha visto que la PO₂ es capaz de reducir la probabilidad de apertura de los canales de K⁺ sensibles a O₂ en parches de membrana, en configuración *inside-out* perfundidos con solución salina (Ganfornina y López-Barneo, 1991) a diferencia de lo que ocurre en las células gustativas (Avenet et al., 1988). El efecto activador del AMPc sobre la maquinaria exocitótica fue demostrado por el hecho de que la liberación de CA inducida por ionomicina, un ionóforo de Ca²⁺, era potenciada por FSK.

Otro punto a señalar es que la cascada de transducción del estímulo hipóxico es compleja e implica a un gran número de NT. Muy recientemente, Conde y cols. (2008) han presentado evidencia farmacológica directa de que las cascadas de transducción de los receptores de adenosina A2B y los de dopamina D2, convergen para controlar los niveles de AMPc en las CQCC y su velocidad de liberación de CA, de modo que los agonistas de los receptores de dopamina D2 inhiben la producción de AMPc en el CC y los agonistas de los receptores de adenosina A2B la potencian. La interpretación es que ambos receptores podrían ejercer acciones opuestas sobre la AC y por lo tanto sobre los niveles de AMPc. Adicionalmente puede hipotetizarse un acoplamiento receptor-receptor a nivel de la membrana plasmática entre los receptores A2B y D2. Este acoplamiento disminuiría la afinidad de los receptores D2 para la DA cuando los receptores A2B estuvieran ocupados por adenosina, y por lo tanto la adenosina liberada endógenamente estaría activando en normoxia la liberación de CA de las CQ.

Para la determinación de la actividad de las CQCC, existen varios enfoques experimentales como son el estudio de los mecanismos de membrana mediante electrofisiología, el estudio de las variaciones en la [Ca²⁺]_i y el análisis de la

respuesta neurosecretora. Siguiendo este último enfoque de respuesta integrada, considerada el *output* último de la transducción sensorial en las CQCC, hemos tratado de verificar si la vía de señalización AMPc-PKA-Epac estaba implicada en la cascada de transducción del estímulo hipóxico, del estímulo ácido o bien en aquellas situaciones donde ambos estímulos ocurren de manera simultánea.

La inhibición de la AC_{tm} disminuye aproximadamente el 60% de la secreción de ³H-CA evocada por la hipoxia (**Figura R20**) sin alterar su curso temporal, tanto en CC controles como HC. El uso de este fármaco no afecta ni a la secreción basal, ni a la liberación inducida por el estímulo despolarizante de alto K⁺_e (**Figuras R20**) revelando un efecto específico de la AC-AMPc en la respuesta del CC a la hipoxia. Estos datos están en consonancia con estudios previos del grupo (Pérez García et al., 1990) que mostraban que la incubación de los CC con 30 mM de K⁺ y 60 mM de K⁺ en presencia de IBMX provocaba un aumento de AMPc, mientras que en los medios con IBMX y libres de Ca²⁺ ninguna de las concentraciones de K⁺ modificaba los niveles de AMPc. Además, la FSK (un activador de la AC) potenciaba la liberación inducida por hipoxia y no la inducida por alto potasio (Pérez García, 1991) indicando que el alto K⁺ no activa la adenilato ciclasa directamente, sino a través de la acción secundaria de los NT liberados (Pérez-García et al., 1990; Cachero et al., 1996; Rocher et al., 2009). Luego podemos concluir que la hipoxia es el único estímulo en el CC capaz de activar la AC de un modo directo y que la mayor ganancia de la hipoxia para desencadenar la liberación de NT está mediada por un mecanismo dependiente de AMPc.

Puesto que el efector clásico de la vía de la AC-AMPc es la PKA, nuestro siguiente objetivo, una vez demostrada la implicación de la AC en la cascada de transducción hipóxica, fue estudiar su participación. Para ello utilizamos un inhibidor de la misma (H89; Hidaka et al., 1991) a una dosis habitual en la bibliografía (10 μM; Thompson y Wyatt, 2011). El resultado obtenido como muestra la **Figura R21**, fue una gran potenciación de la liberación basal de CA tanto en CC normóxicos como HC, hecho que nos hizo sospechar que se trataba de un efecto tóxico de la droga, motivo por el cual decidimos emplear una dosis más baja (1 μM). Dicha dosis no produjo ninguna modificación en la respuesta secretora del

CC. Recientemente se ha puesto en duda la especificidad del H89 para inhibir a la PKA (Lochner y Moolman, 2006) ya que se ha encontrado que esta sustancia es capaz de inhibir también al menos 8 quinasas diferentes (MAPKAP-K1b, MSK1, KB α , SGK, S6K1, ROCK II, AMPK, y CHK1) en un 80-100% cuando se utiliza a una dosis 10 μ M. La utilización de otros inhibidores (KT-5720 y Rp-cAMPs) y activadores (6-Bnz-cAMP) de la vía de la PKA (**Figura R22**) tampoco modificó la secreción de CA frente al estímulo hipóxico, llevándonos a excluir la participación de la PKA en la cascada de transducción hipóxica. Estos resultados están en consonancia con estudios previos del grupo (Rocher et al., 2009) realizados sobre CQCC de conejo, donde el uso de los inhibidores de la vía de la PKA (H89, KT-5720 o Rp-cAMPs) no produjo ningún efecto sobre la liberación de CA con el estímulo hipóxico descartando la participación de esta vía de señalización.

El hecho de descartar la participación de la PKA como diana de los aumentos del AMPc en el CC nos llevó a estudiar otros posibles efectores del AMPc, en concreto de la cascada descrita recientemente para AMPc mediada por proteínas Epac (Seino y Shibasaki, 2005). Utilizando el único inhibidor de Epac inicialmente disponible, la brefeldina A (BFA), encontramos que ésta era capaz de inhibir un 30% la liberación de CA tanto en CC de ratas normóxicas como HC, sin afectar la respuesta del CC al alto K⁺_e, sugiriendo que la vía del Epac se activa por hipoxia. Esta sugerencia fue verificada por el uso de 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, un activador específico de Epac (**Figura R24**), que no activa a PKA. Dicho activador es capaz de revertir el efecto del inhibidor de la AC (SQ-22536). Los datos experimentales sugieren por lo tanto que los mecanismos implicados en la potenciación de AMPc de la liberación hipóxica están mediados por Epacs (o factores de intercambio de nucleótidos de guanina regulados por AMPc o cAMP-GEFs). Las proteínas Epac están implicadas en múltiples procesos celulares. Uno de los primeros papeles asignados a Epac, y en particular a Epac 2 es la regulación de la exocitosis de insulina, sugiriendo que esta cAMP-GEF podía ser una diana farmacológica relevante para el tratamiento de la diabetes (Kang et al., 2003; Kashima et al., 2001). Se sabe que las GTPasa tipo Ras: Rap1 y Rap2 son los efectores directos de Epac (Bos et al., 2003; Somekawa et al., 2005). Los efectos más relevantes de la vía Epac-Rap en nuestro contexto, se refieren a la dinámica de

vesículas o gránulos secretores, facilitando el *predocking* y *docking* de los mismos y por tanto facilitando la secreción. En otros sistemas (e.g., cardiomiocitos, McConnachie et al., 2006) Epac facilita el anclaje de AKAP en dominios específicos de la célula y su unión con AMPc, lo que permitiría compartimentalizar la acción de este segundo mensajero. El mecanismo molecular de acción de las Epacs sobre la secreción y neurotransmisión lo recoge el esquema de la **Figura D4** modificada de Holz et al. (2006) donde se muestra que el AMPc ejerce sus efectos a través de Epac 2, que forma un heterodímero con Rim 2, una molécula que interacciona con la GTPasa Rab3A, que juega un papel central en la regulación de la exocitosis dependiente de Ca^{2+} . A través de un mecanismo todavía no definido, el AMPc actúa a través de Epac 2 para permitir que Rim 2 promueva el cebado de los gránulos secretores, convirtiéndolos en gránulos eficaces y activos para la liberación (Ozaki et al., 2000; Seino & Shibasaki, 2005). Como Rab3A está localizada en la superficie citoplasmática de los gránulos secretores anclados en la membrana plasmática, su habilidad para reclutar heterodímeros de Rim 2 y Epac 2 podría explicar la acción del AMPc sobre el aumento de tamaño del *pool* fácilmente liberable de los gránulos secretores disponibles para la exocitosis (Seino & Shibasaki, 2005).

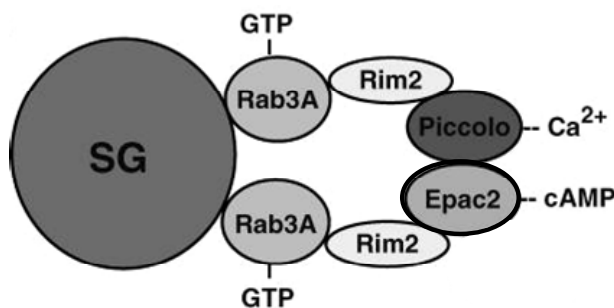


Fig D4. Interacciones de Epac 2 con proteínas asociadas a gránulos secretores. En el modelo Epac 2, Rim 2 y Piccolo forman un complejo macromolecular que interacciona con la forma unida a GTP de Rab 3A para regular el cebado y la exocitosis de los gránulos secretores (SG). Este modelo también puede aplicarse a las terminaciones nerviosas presinápticas en las cuales las vesículas sinápticas se encuentran en una estrecha asociación con Rim1. (Modificada de Holz et al., 2006).

Al unirse a AMPc, los dominios GEF de Epac catalizan el intercambio de GDP por GTP en pequeñas proteínas de unión a GTP, lo que conduce a su activación. Ozaki y cols. (2000) demostraron que la acción secretagoga de Epac2 resultaba de su interacción directa con proteínas asociadas a los gránulos secretores, Rim2 y Piccolo. Al mismo tiempo, a través de una proteína pequeña de unión a GTP diferente, Rap-1, Epac puede conducir a la activación cascada abajo de

la quinasa regulada por la señal extracelular (ERK) y la quinasa activada por mitógeno (MAPK) y la modulación de los canales de K⁺ (Yuan y Chen, 2006).

Nuestra hipótesis propone que la maquinaria excitotóxica o los canales de K⁺ pueden ser las dianas para la regulación independiente de la PKA mediada por AMPc durante la estimulación hipóxica, ya que como han mostrado los experimentos previos del grupo, los análogos de AMPc (dibutirilcAMP) mimetizan la hipoxia inhibiendo las corrientes de K⁺ en CQCC de conejo (López-López, 1993). Otras dianas potenciales de Epac como los canales de Ca²⁺ y los depósitos intracelulares podrían ser excluidos en el caso de las CQ porque los análogos de AMPc no modifican las corrientes de Ca²⁺ en las CQ (López-López, 1993) y porque los depósitos de Ca²⁺ intracelular parecen tener una importancia mínima en el control de los niveles de Ca²⁺ libre (Vicario, 2000 b; Conde, 2006 b). Los canales aniónicos y las uniones tipo *gap* en las CQ también están reguladas por AMPc pero no se sabe si esta regulación es dependiente o independiente de PKA.

En este trabajo demostrado también, por primera vez, que Epac 1 y Epac 2 se expresan en el CC de rata (**Figura R25**) en las CQ (**Figura R26**) y que, por tanto, una de ellas o ambas pueden mediar el efecto potenciador descrito. Se ha citado que en la rata, el RNAm de Epac 1 está ampliamente expresado, mientras que el RNAm de Epac 2 está más restringido a los tejidos neurales. La proteína Epac parece estar regulada durante el desarrollo en el SNC de la rata, siendo Epac 1 la isoforma dominante en tejidos embrionarios, pero está disminuida (*down* regulada) en tejidos adultos. Por el contrario, Epac 2 está más expresada después del nacimiento (Peace y Shewan, 2011). En el CC de rata, encontramos que Epac 1 es la isoforma predominante en relación a la expresión de β actina, siendo Epac 2 una isoforma inducible por hipoxia (**Figura R25**). Aunque no está claro si este patrón de expresión dinámica tiene alguna importancia funcional, sugiere distintos papeles para Epac 1 y 2. De hecho no se sabe si las acciones de Epac1 y Epac 2 son distintas; el único criterio para pensar que poseen distintas acciones es que la expresión de ambas tiene cierta especificidad según hemos comentado. Los inhibidores supuestamente específicos de Epac 1 y 2 que nosotros hemos utilizado parecen proporcionar datos que sugieren cierta especificidad de acciones de ambos Epacs

aunque lo que es cuestionable es la especificidad de los inhibidores (Rehmann, 2013; ver más adelante).

La discriminación entre las vías de señalización dependientes de PKA y de Epac se ha visto obstaculizada por la falta de agentes específicos para cada una de estas proteínas, ya que el inhibidor clásico de las mismas, la BFA no es totalmente específico. Muy recientemente en Octubre de 2012 se han identificado nuevos inhibidores de última generación de las proteínas Epac (Chen et al., 2012), que son compuestos 5-ciano-6-oxo-1,6-dihidro-pirimidina ESI-08, (HJC0198) y (HJC0197) que bloquean selectivamente la activación de Epac inducida por AMPc, pero no inhiben la activación de la PKA. Estos compuestos son incluso capaces de diferenciar las isoformas Epac1 y Epac 2 de forma supuestamente específica como en el caso de ESI-05 y ESI-07 que actúan como inhibidores exclusivos de Epac 2 (Tsalkova et al., 2012). Como muestran las **Figuras R27 y R28**, el uso de los compuestos ESI-09 y HJC0197 (inhibidores tanto de Epac 1 como de Epac 2) utilizados a las dosis recomendadas, provoca un marcado efecto sobre la liberación basal independientemente de la aplicación del estímulo, sugiriendo un efecto tóxico sobre el CC, lo que nos llevó a descartarlos, considerándolos inadecuados para nuestra preparación. Respecto al inhibidor específico de Epac 2, el ESI-05, (**Figura R28**) la aplicación de la droga tanto a dosis bajas como altas, no produjo ningún efecto significativo, por lo que concluimos que o bien Epac 2 no participa en la señalización de la cascada de transducción del estímulo hipóxico, o bien la droga no es adecuada para nuestra preparación. En conclusión, estos nuevos inhibidores sintéticos que en principio resultaban prometedores, no nos han permitido diferenciar la participación de una o ambas isoformas de Epac en la vía de señalización activada por la hipoxia en el CC de rata, en contra de nuestras expectativas.

Puesto que los primeros resultados obtenidos en nuestro laboratorio respecto al estudio de los efectos de la HC sostenida en el CC de rata (Cáceres, 2007, Tesis Doctoral) revelaban que la sensibilización de la respuesta a la hipoxia aguda era menor que la que se producía en respuesta a la acidosis hipercápnica, tanto a nivel del CC *in vitro* como a nivel de ventilación en el animal entero,

decidimos probar si la vía del AMPc/Epac podía participar en la señalización del estímulo ácido y por tanto, en la sensibilización a la acidosis observada tras la exposición a HC. Los datos de estos estudios se muestran en la **Figura R29** y nos llevaron a concluir que la vía AMPc- Epac no participaba en la transducción del estímulo ácido hipercápnico en el CC de ratas normóxicas, pero sorprendentemente sí parece estar implicada en la señalización del estímulo ácido en los CC adaptados a la HC.

Un paso crucial en el proceso de transducción de la hipercapnia del CC parece ser la hidratación intracelular del CO₂ para formar HCO₃⁻ y H⁺, una reacción catalizada por la anhidrasa carbónica (Rigual et al., 1991, 1985; Iturriaga et al., 1991; Travis, 1971; Zhang y Nurse, 2004). El aumento de la PCO₂ extracelular a HCO₃⁻ constante (hipercapnia ácida) está acoplado con una reducción en el pHi en las CQCC (Buckler et al., 1991 a).

Por tanto, nos propusimos estudiar si la AC soluble pudiera estar implicada en esta sensibilización utilizando su inhibidor específico (KH7), sobre la respuesta inducida por la acidosis hipercápnica (20% CO₂, pH 6.6), de forma aislada y de forma conjunta con el inhibidor de la ACtm (SQ-22536). Sin embargo, el gran aumento de secreción basal encontrado, con un 250% de potenciación, nos hace sospechar que esta droga, el KH7, está actuando de forma inespecífica sobre las CQCC con efectos independientes de la ACs (Bitterman et al., 2013; Tian et al., 2011). Recientemente, se ha descrito que posee un efecto desacoplante en la mitocondria independiente de sus acciones sobre la ACs (Di Benedetto et al., 2013), lo que nos llevó a descartar su uso. Estos resultados no nos permiten decidir si la ACs de las CQCC contribuye o no a la señalización del estímulo ácido, actuando como posible sensor del HCO₃⁻ en los CC de las ratas mantenidas en HC, pero basándonos en los resultados obtenidos sobre acumulación de AMPc (**Figura R19**) en CQCC nos atrevemos a descartar su participación.

Cuando analizamos la posible implicación de la PKA, de los resultados obtenidos (**Figura R31A**) se deduce que la aplicación del inhibidor de la quinasa (H89) utilizado a las mismas condiciones que en los experimentos de estimulación hipóxica, produce una marcada potenciación con la dosis más alta, de forma

similar a como ocurría con la respuesta a la hipoxia (**Figura R21**). La posibilidad de que este efecto inespecífico del H89 fuera debido a una desinhibición de la entrada capacitativa de Ca^{2+} o a una activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje como ocurre en otras preparaciones (Liu et al., 2005), se exploró usando conjuntamente H89 junto con un inhibidor de la entrada capacitativa de Ca^{2+} (2-APB), y un inhibidor de los VOCC (Nifedipina). La aplicación de ninguna de estas drogas modificó los efectos del H89, excluyendo estas vías como responsables de su efecto. Los efectos mostrados del activador de PKA (6Bnz-cAMP), del inhibidor de Epac (BFA) y del activador de Epac (8pCPT-2'-O-Me-cAMP) junto con SQ-22536 sobre la respuesta inducida por acidosis hipercápnica son similares a los obtenidos cuando el estímulo aplicado es hipoxia y ponen de manifiesto que durante la exposición a HC en los CC de rata, probablemente se activa la producción basal de AMPc y la vía de señalización de éste parece cobrar mayor importancia (**Figura R31C**), asemejándose a la de la hipoxia.

Por tanto, la vía del AMPc en la cascada de transducción hipercápnica parece cobrar protagonismo en los CC de animales expuestos a HC, a diferencia de lo que ocurre en la respuesta a la estimulación hipóxica donde afecta por igual a CC de ratas normóxicas e HC. En un estudio reciente de nuestro laboratorio (Rocher et al., 2009) se demostró la mayor eficacia de la acidosis hipercápnica (20% CO_2 , pH 6.6) que de la hipoxia moderada (PO_2 46mmHg) en despolarizar las CQ aisladas de conejo mientras que en términos de secreción, el estímulo ácido hipercápnico, es bastante menos eficiente que la hipoxia moderada. Basado en múltiples observaciones, los datos de este estudio (Rocher et al., 2009) sugieren que la mayor ganancia de la hipoxia para desencadenar la liberación de NT está mediada por un mecanismo dependiente de AMPc porque la hipoxia y no el alto K^+ , produce un aumento en los niveles de AMPc en el CC (Pérez-García et al., 1990). La observación adicional de que las respuestas secretoras independientes de AMPc desencadenadas por acidosis hipercápnica en el CC normóxico se comportan como dependientes de AMPc en CC de animales en HC y el hecho de que la expresión de Epac 2 cambie en HC, sugiere la aparición de cambios importantes en la vía de Epac en la quimiorrecepción del CC tras la exposición a HC.

Como ya hemos comentado en la Introducción, los CC son los responsables de toda la hiperventilación que ocurre en hipoxia hipóxica (Lahiri y Delaney, 1976) y del 25-40% de la hiperventilación compensatoria que ocurre en acidosis (Nattie, 1999). Estos reflejos ventilatorios se inician a nivel de las CQ que representan los elementos sensores de la PO₂ y de los H⁺ (González et al., 1994). Las CQ en respuesta a estos estímulos aumentan su velocidad basal de liberación de NT que a su vez aumenta la frecuencia de los PA en el NSC, aunque el estímulo ácido también podría estimular directamente las terminaciones nerviosas del NSC contribuyendo a incrementar la frecuencia del NSC en acidosis (Rigual et al., 1984). Cuando se evalúa la actividad del CC a nivel del NSC o sobre la ventilación, existe una interacción entre el estímulo hipóxico e hipercápnico de modo que la respuesta a la aplicación de ambos estímulos es aditiva o más que aditiva en un amplio rango de valores de estimulación hipóxica, aunque hipoxias severas sean capaces de desencadenar respuestas máximas independientemente de la intensidad de la estimulación acida (Fitzgerald y Parks, 1971; Lahiri y Delaney, 1975; Fitzgerald, 1976; Pepper et al., 1995). Ya que en las células de feocromocitoma PC12 (Taylor et al., 1999) y en células de medula adrenal de rata (Rico et al., 2005) se ha descrito que la estimulación ácida e hipóxica es sinérgica en desencadenar la secreción de CA, parece que en el CC, la interacción también puede ocurrir a nivel de las CQ. De hecho, en CQCC aisladas, la hipoxia y el ácido son también sinérgicos en desencadenar un aumento en los niveles de Ca²⁺ intracelular (Dasso et al., 2000). En el presente estudio demostramos que la interacción entre ambos estímulos fisiológicos también ocurre a nivel de la liberación de NT y en etapas muy tempranas en la cascada de transducción, y que la hipoxia y la acidosis hipercápnica interaccionan de forma sinérgica (**Figura R32**) sobre la despolarización de las CQ (Ramírez et al., 2012). Además, según muestran los datos de la **Figura R33**, la interacción positiva entre ambos estímulos está mediada por AMPc ya que la inhibición de la AC elimina totalmente la potenciación sobre la liberación de CA, y la proteína Epac participa en dicho proceso, ya que existe una reversión de esta inhibición cuando, junto con el inhibidor de la ACtm, se aplica el activador de Epac, 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP. En conjunto, todos estos datos nos llevan a concluir que hay una interacción positiva entre la hipoxia y el estímulo

ácido/hipercápnico a nivel de la despolarización de la membrana y en segundo lugar a nivel de la respuesta secretora en las CQ, estando esta última interacción mediada por una vía de señalización dependiente de AMPc-Epac.

El hallazgo de que un mecanismo endógeno dependiente de AMPc está potenciando el acoplamiento del estímulo hipóxico e hipercápnico a la exocitosis, sugeriría que la vía de Epac está activando la entrada de Ca^{2+} y en consecuencia la liberación de NT dependiente de Ca^{2+} . Aunque los canales de Ca^{2+} han sido descritos como dianas potenciales para Epac (Seino y Shibasaki, 2005), esta posibilidad debe ser excluida en el caso de las CQCC porque los análogos de AMPc no modifican las corrientes de calcio en las CQCC (López-López et al., 1993) ni en CC controles ni en los provenientes de CC de animales HC (Carpenter et al., 1998). La maquinaria excitotóxica y los canales de K^+ serían dianas alternativas de la regulación dependiente de Epac mediada por AMPc durante la estimulación hipóxica/hipercápnica ácida, de acuerdo con la potenciación mencionada arriba de la liberación excitotóxica y la despolarización de Em inducida por ambos estímulos.

3. ASPECTOS GENERALES: UNA VISIÓN INTEGRADA

Para finalizar la discusión e interpretación de los datos recogidos en esta Tesis Doctoral queremos proponer el siguiente modelo de transducción hipóxica en las CQCC de rata (**Figura D5**), que recoge tanto los resultados de nuestros estudios como datos previos del grupo (Cachero, 1994; Cáceres, 2007, Tesis Doctorales).

En condiciones de normoxia, las CQ mantendrán un Em de -60 a -50 mV, como resultado del balance en la difusión de iones a través de los canales de K^+ *leaky* (TASK-1/TASK-3) y de otros iones tales como Na^+ y Cl^- , aparte de la contribución de los transportadores electrogénicos; su $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en reposo sería baja (~100 nM). Con la llegada del estímulo hipóxico, el sensor de O_2 , de naturaleza desconocida hasta la fecha, facilita la inhibición de los canales de K^+ provocando el cierre de los mismos y el cese de la salida del ion y una activación de la AC. Nuestro grupo apoya la hipótesis (ver González et al., 2010) de que el sensor es una hemoproteína (quizás NOX4) que detecta la caída en la PO_2 mediante un cambio conformacional que transmite alostéricamente a los canales TASK que se inhiben y

provocan el comienzo de la despolarización de la membrana, entrando en juego otro tipo de canales como los de Na⁺ y los de Ca²⁺ de bajo umbral (tipo T).

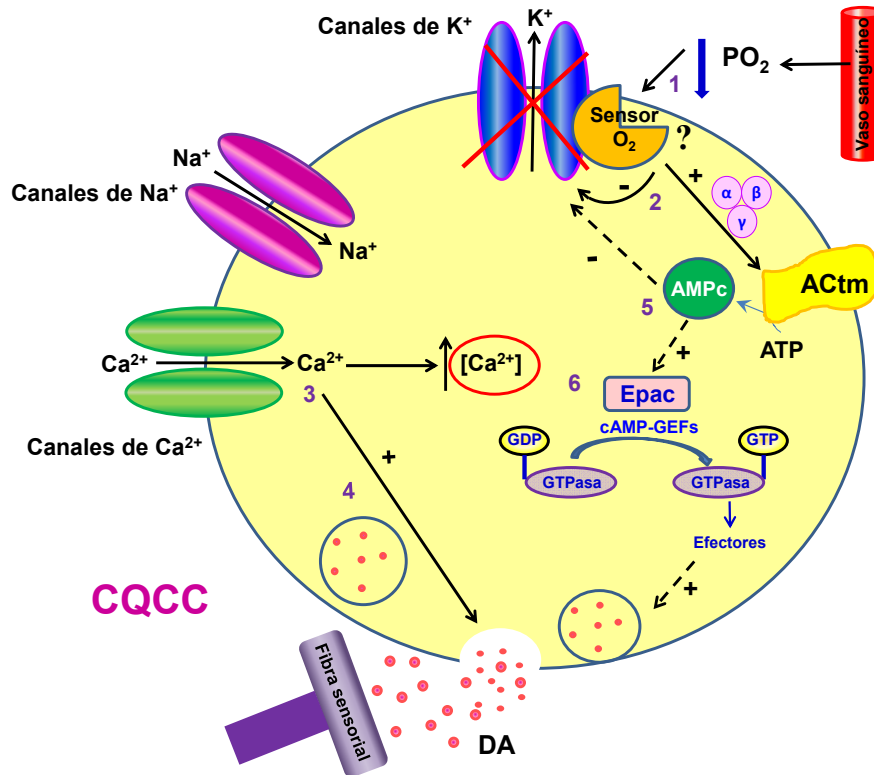


Figura D5. Esquema propuesto del proceso de transducción hipóxica en el CC.

Los canales de Ca²⁺ voltaje dependientes de alto umbral estarían todavía cerrados y los maxi-K completamente inhibidos por la hipoxia. Cuando la membrana llega a potenciales de -40mV otros canales iónicos se activan, como los canales de Na⁺ y de Ca²⁺ de alto umbral (tipo L) que promoverían una mayor despolarización, generando un PA que llevaría el Em a valores próximos a 0 mV, lo que provocaría un aumento de la [Ca²⁺]_i y una posible activación de los canales maxi-K. La presunta activación de los canales maxi-K y otros Kv, repolarizarían la membrana y el ciclo se repetiría mientras se mantenga el estímulo hipóxico. Durante cada PA, una cantidad determinada de Ca²⁺ accedería a la célula a través de los canales tipo L proporcionando el Ca²⁺ necesario para la secreción de NT.

Por otra parte, la activación de la ACtm por la hipoxia con la participación (o no) de proteínas G heterotriméricas, aumenta los niveles de AMPc que pueden modular por un lado las corrientes de K⁺ potenciando la inhibición provocada por la hipoxia y por otro lado, actuando sobre la maquinaria excitotóxica. Es en este

segundo paso donde participaría Epac (1 y/o 2), en la facilitación del proceso de exocitosis, provocando la activación de distintos efectores implicados en la secreción de NT. Proponemos por lo tanto, que la mayor ganancia observada al aplicar el estímulo hipóxico con respecto a la estimulación ácida en CC de ratas controles, se debe a la activación directa de la AC por la baja PO_2 , lo que promueve un aumento de los niveles de AMPc que desencadenan la secreción de CA mediante la vía del Epac. Aún quedan sin embargo muchas incógnitas por resolver cómo cual es la participación de Epac 1 o 2 en dicha cascada de señalización, así como cuáles serían sus moléculas efectoras (posiblemente Rab3, Rim2) o el estudio de la posible implicación de complejos formados por proteínas AKAP que integren varias vías de señalización (PKA, Epac, PDE) tal y como se ha sugerido en cardiomiocitos, lo que permitirán caracterizar por completo la cascada de transducción hipóxica y serán objeto de futuros trabajos del grupo.

En cuanto a los procesos de remodelado sufridos por los CC durante la HC, nuestros datos también sustentan la idea, de que la mayor sensibilización encontrada en los CC expuesto a HC, se debe a una participación de la vía AC-Epac que parece estar potenciada también para el caso del estímulo ácido, ya que participa de forma específica en la cascada de transducción de los CC tras HC, así como en la potenciación observada en la estimulación hipóxica aplicada de forma simultánea con acidosis hipercápnica para el CC de rata.

Conclusiones

1. La exposición a una atmósfera hiperóxica (55-60%O₂) en el periodo perinatal produce, en ratas, pérdida de la VPH, hipofuncionalidad del CC y daño oxidativo en pulmón e hígado durante la primera semana de vida postnatal, normalizándose sólo el daño oxidativo en el estado adulto (90 días).
2. La administración de una dieta suplementada con antioxidantes (ácido lipoico y vitamina E) revierte por completo la pérdida de la VPH observada en los animales hiperóticos, sin alterar las respuestas de la circulación sistémica a la hipoxia.
3. La suplementación con antioxidantes no revierte la hipofuncionalidad del CC medida bien como aumento de la respuesta secretora de CA bien como aumento de la síntesis de AMPc frente a la hipoxia aguda.
4. La suplementación con antioxidantes revierte el daño observado en pulmón e hígado a los 7 días, pero produce un cambio oxidativo permanente en cerebro tanto a 7 como a 90 días, sugiriendo un comportamiento específico del cerebro con respecto al resto de órganos.
5. Estudios electrofisiológicos realizados en CMLAP de las ratas expuestas a hiperoxia perinatal descartan que el elemento dañado en la cascada de transducción hipóxica que impide que se desarrolle la VPH sean los canales de K⁺ sensibles a O₂ o una producción incrementada de ROS, ya que ambos parámetros son similares a los de las CMLAP de ratas controles. De esto se concluye que ambos elementos, canales de K⁺ y/o ROS pueden ser necesarios pero no suficientes para disparar la VPH.
6. La exposición a hipoxia crónica mantenida (10-11% O₂; 7 días) produce cambios en la señalización a través de AMPc, duplicando los valores basales y manteniendo los estimulados por hipoxia aguda respecto a los CC de ratas normóxicas. Este patrón cambia cuando la hipoxia crónica es intermitente: se produce una potenciación del aumento de AMPc en respuesta a la hipoxia aguda sin cambios en los valores basales. Lo opuesto sucede en CC hiperóticos. De ello se concluye que diferentes patrones de cambios en los niveles de AMPc pueden ser responsables de

la diferente sensibilización que la hipoxia intermitente o mantenida produce en el CC de rata.

7. Durante la aclimatación de ratas expuestas a hipoxia sostenida se produce un aumento de la respuesta secretora Ca^{2+} dependiente del CC frente a la hipoxia aguda. Se descartan cambios apreciables en la funcionalidad y expresión de los canales de Ca^{2+} tipo L, como se demuestra mediante RT-PCR, Western Blot e inmunocitoquímica.

8. La inhibición farmacológica de la AC o de la proteína Epac, pero no de la PKA, disminuye entre 50-70% la respuesta del CC a la hipoxia aguda tanto en ratas normóxicas como hipóxicas crónicas. Un activador de Epac, el 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP, revierte el efecto de la inhibición farmacológica de la AC. Se concluye que en CC controles o en HC, la hipoxia aguda activa una vía mediada por AMPc/Epac.

9. Los CC de ratas normóxicas e HC expresan Epac 1 y Epac 2, de aproximadamente 100kDa, colocalizando con TH. La proteína Epac 2 aparece como una banda desdoblada, una de las cuales parece inducirse en CC de ratas expuestas a HC.

10. La vía AMPc-Epac participa en la transducción del estímulo ácido hipercápnico en el CC de ratas expuestas a HC pero no en CC controles. Dicha vía parece regular también la interacción sinérgica observada entre la hipoxia y el estímulo ácido/hipercápnico en el CC, al menos a nivel de la respuesta secretora.

Bibliografía

- 1 **Abu-Soud HM, Rousseau DL, Stuehr DJ. 1996.** Nitric oxide binding to the heme of neuronal nitric-oxide synthase links its activity to changes in oxygen tension. *J Biol Chem* **271**: 32515-32518.
- 2 **Agapito MT, Sanz-Alfayate G, Gómez-Nino A, González C, Obeso A. 2009.** General redox environment and carotid body chemoreceptor function. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**: C620-C631.
- 3 **Almaraz L, Obeso A, González C. 1984.** Metabolic dissociation of carotid body chemoreceptors responses to different types of stimulation: preliminary findings. In: *The Peripheral Arterial Chemoreceptors*. D.J.Pallot ed. London: 141-153.
- 4 **Almaraz L, González C, Obeso A. 1986.** Effects of high potassium on the release of [3H]dopamine from the cat carotid body in vitro. *J Physiol* **379**: 293-307.
- 5 **Álvarez-Buylla R, Álvarez-Buylla E, Mendoza H, Montero SA, Álvarez-Buylla A. 1997.** Pituitary and adrenals are required for hyperglycemic reflex initiated by stimulation of CBR with cyanide. *Am J Physiol* **272**: R392-R399.
- 6 **Archer S, Michelakis E. 2002.** The mechanism(s) of hypoxic pulmonary vasoconstriction: potassium channels, redox O₂ sensors, and controversies. *News Physiol Sci* **17**: 131-137.
- 7 **Archer SL, Wu XC, Thebaud B, Nsair A, Bonnet S, Tyrrell B, McMurtry MS, Hashimoto K, Harry G, Michelakis ED. 2004.** Preferential expression and function of voltage-gated, O₂-sensitive K⁺ channels in resistance pulmonary arteries explains regional heterogeneity in hypoxic pulmonary vasoconstriction: ionic diversity in smooth muscle cells. *Circ Res* **95**: 308-318.
- 8 **Archer SL, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Rich S, Garcia JG, Weir EK. 2008.** Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**: H570-H578.
- 9 **Armitage ME, Wingler K, Schmidt HH, La M. 2009.** Translating the oxidative stress hypothesis into the clinic: NOX versus NOS. *J Mol Med (Berl)* **87**: 1071-1076.
- 10 **Avenet P, Hofmann F, Lindemann B. 1988.** Transduction in taste receptor cells requires cAMP-dependent protein kinase. *Nature* **331**: 351-354.
- 11 **Balligand JL, Feron O, Dessy C. 2009.** eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiol Rev* **89**: 481-534.
- 12 **Basuroy S, Bhattacharya S, Leffler CW, Parfenova H. 2009.** Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF- α in cerebral vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**: C422-C432.
- 13 **Bavis RW, Wenninger JM, Miller BM, Dmitrieff EF, Olson EB, Jr., Mitchell GS, Bisgard GE. 2008.** Respiratory plasticity after perinatal hyperoxia is not prevented by antioxidant supplementation. *Respir Physiol Neurobiol* **160**: 301-312.
- 14 **Bavis RW, Fallon SC, Dmitrieff EF. 2013.** Chronic hyperoxia and the development of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* **185**: 94-104.
- 15 **Behan M, Zabka AG, Mitchell GS. 2002.** Age and gender effects on serotonin-dependent plasticity in respiratory motor control. *Respir Physiol Neurobiol* **131**: 65-77.
- 16 **Berkenbosch A, Heeringa J, Olivier CN, Kruyt EW. 1979.** Artificial perfusion of the ponto-medullary region of cats. A method for separation of central and peripheral effects of chemical stimulation of ventilation. *Respir Physiol* **37**: 347-364.
- 17 **Berkenbosch A, van DJ, Olivier CN, de GJ, Herringa J. 1979.** The contribution of the peripheral chemoreceptors to the ventilatory response to CO₂ in anaesthetized cats during hyperoxia. *Respir Physiol* **37**: 381-390.
- 18 **Beutner A. 1852.** Ueber die Strom-und Druckkräfte des Blutes in der Arteria pulmonalis. 97-138.

- 19 **Bin-Jaliah I, Maskell PD, Kumar P. 2004.** Indirect sensing of insulin-induced hypoglycaemia by the carotid body in the rat. *J Physiol* **556**: 255-266.
- 20 **Bin-Jaliah I, Maskell PD, Kumar P. 2005.** Carbon dioxide sensitivity during hypoglycaemia-induced, elevated metabolism in the anaesthetized rat. *J Physiol* **563**: 883-893.
- 21 **Bisgard GE. 2000.** Carotid body mechanisms in acclimatization to hypoxia. *Respir Physiol* **121**: 237-246.
- 22 **Bisgard GE, Olson EB, Jr., Wang ZY, Bavis RW, Fuller DD, Mitchell GS. 2003.** Adult carotid chemoafferent responses to hypoxia after 1, 2, and 4 wk of postnatal hyperoxia. *J Appl Physiol* **95**: 946-952.
- 23 **Bisgard GE, Olson EB, Jr., Bavis RW, Wenninger J, Nordheim EV, Mitchell GS. 2005.** Carotid chemoafferent plasticity in adult rats following developmental hyperoxia. *Respir Physiol Neurobiol* **145**: 3-11.
- 24 **Bitterman JL, Ramos-Espiritu L, Díaz A, Levin LR, Buck J. 2013.** Pharmacological distinction between soluble and transmembrane adenylyl cyclases. *J Pharmacol Exp Ther* **347**: 589-598.
- 25 **Borowsky IW, Collins RC. 1989.** Metabolic anatomy of brain: a comparison of regional capillary density, glucose metabolism, and enzyme activities. *J Comp Neurol* **288**: 401-413.
- 26 **Bos JL, de BK, Enserink J, Kuiperij B, Rangarajan S, Rehmann H, Riedl J, de RJ, van MF, Zwartkruis F. 2003.** The role of Rap1 in integrin-mediated cell adhesion. *Biochem Soc Trans* **31**: 83-86.
- 27 **Boycott AE, Haldane JS. 1908.** The effects of low atmospheric pressures on respiration. *J Physiol* **37**: 355-377.
- 28 **Bradford JR, Dean HP. 1894.** The Pulmonary Circulation. *J Physiol* **16**: 34-158.
- 29 **Braun CM, Huang SK, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM, Essayan DM. 1998.** Co-regulation of antigen-specific T lymphocyte responses by type I and type II cyclic AMP-dependent protein kinases (cAK). *Biochem Pharmacol* **56**: 871-879.
- 30 **Buck J, Sinclair ML, Schapal L, Cann MJ, Levin LR. 1999.** Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 79-84.
- 31 **Buckler KJ, Vaughan-Jones RD, Peers C, Lagadic-Gossmann D, Nye PC. 1991.** Effects of extracellular pH, PCO₂ and. *J Physiol* **444**: 703-721.
- 32 **Buckler KJ, Vaughan-Jones RD, Peers C, Nye PC. 1991.** Intracellular pH and its regulation in isolated type I carotid body cells of the neonatal rat. *J Physiol* **436**: 107-129.
- 33 **Buckler KJ, Vaughan-Jones RD. 1993.** Effects of acidic stimuli on intracellular calcium in isolated type I cells of the neonatal rat carotid body. *Pflugers Arch* **425**: 22-27.
- 34 **Buckler KJ, Vaughan-Jones RD. 1994.** Effects of hypercapnia on membrane potential and intracellular calcium in rat carotid body type I cells. *J Physiol* **478 (Pt 1)**: 157-171.
- 35 **Buckler KJ, Vaughan-Jones RD. 1994.** Role of intracellular pH and [Ca²⁺]_i in acid chemoreception in type-I cells of the carotid body. *Adv Exp Med Biol* **360**: 41-55.
- 36 **Buckler KJ, Williams BA, Honore E. 2000.** An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol* **525 Pt 1**: 135-142.
- 37 **Buckler KJ. 2012.** Effects of exogenous hydrogen sulphide on calcium signalling, background (TASK) K channel activity and mitochondrial function in chemoreceptor cells. *Pflugers Arch* **463**: 743-754.
- 38 **Bunday RA, Insel PA. 2004.** Discrete intracellular signaling domains of soluble adenylyl cyclase: camps of cAMP? *Sci STKE* **2004**: e19.
- 39 **Bunn HF, Poyton RO. 1996.** Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* **76**: 839-885.

- 40 **Buttigieg J, Nurse CA. 2004.** Detection of hypoxia-evoked ATP release from chemoreceptor cells of the rat carotid body. *Biochem Biophys Res Commun* **322**: 82-87.
- 41 **Buxton IL, Brunton LL. 1983.** Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *J Biol Chem* **258**: 10233-10239.
- 42 **Cáceres AI. 2007.** *Estudio de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta adaptativa del cuerpo carotídeo a la hipoxia crónica.* Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.
- 43 **Cáceres AI, Obeso A, González C, Rocher A. 2007.** Molecular identification and functional role of voltage-gated sodium channels in rat carotid body chemoreceptor cells. Regulation of expression by chronic hypoxia in vivo. *J Neurochem* **102**: 231-245.
- 44 **Cáceres AI, González-Obeso E, González C, Rocher A. 2009.** RT-PCR and pharmacological analysis of L- and T-type calcium channels in rat carotid body. *Adv Exp Med Biol* **648**: 105-112.
- 45 **Cachero TG. 1994.** *Identificación de las proteínas G del cuerpo carotídeo y su participación en el proceso de quimiorrecepción.* Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.
- 46 **Cachero TG, Rocher A, Rigual RJ, González C. 1995.** Effects of fluoride and cholera and pertussis toxins on sensory transduction in the carotid body. *Am J Physiol* **269**: C1271-C1279.
- 47 **Cachero TG, Rigual R, Rocher A, González C. 1996.** Cholera and pertussis toxins reveal multiple regulation of cAMP levels in the rabbit carotid body. *Eur J Neurosci* **8**: 2320-2327.
- 48 **Cali JJ, Parekh RS, Krupinski J. 1996.** Splice variants of type VIII adenylyl cyclase. Differences in glycosylation and regulation by Ca²⁺/calmodulin. *J Biol Chem* **271**: 1089-1095.
- 49 **Campanucci VA, Fearon IM, Nurse CA. 2003.** O₂-sensing mechanisms in efferent neurons to the rat carotid body. *Adv Exp Med Biol* **536**: 179-185.
- 50 **Carpenter E, Peers C. 1997.** Swelling- and cAMP-activated Cl⁻ currents in isolated rat carotid body type I cells. *J Physiol* **503 (Pt 3)**: 497-511.
- 51 **Carpenter E, Bee D, Peers C. 1998.** Ionic currents in carotid body type I cells isolated from normoxic and chronically hypoxic adult rats. *Brain Res* **811**: 79-87.
- 52 **Carroll JL, Kim I. 2013.** Carotid chemoreceptor "resetting" revisited. *Respir Physiol Neurobiol* **185**: 30-43.
- 53 **Chan ED, Welsh CH. 1998.** Geriatric respiratory medicine. *Chest* **114**: 1704-1733.
- 54 **Chen H, Tsalkova T, Mei FC, Hu Y, Cheng X, Zhou J. 2012.** 5-Cyano-6-oxo-1,6-dihydropyrimidines as potent antagonists targeting exchange proteins directly activated by cAMP. *Bioorg Med Chem Lett* **22**: 4038-4043.
- 55 **Chen J, Jiang W, Cai J, Tao W, Gao X, Jiang X. 2005.** Quantification of lipoic acid in plasma by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **824**: 249-257.
- 56 **Chen W, Cheng D, Wu Q. 1998.** [Changes of the gene expression of vascular endothelial growth factor in the lung of rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension]. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* **29**: 233-236.
- 57 **Chen Y, Harry A, Li J, Smit MJ, Bai X, Magnusson R, Pieroni JP, Weng G, Iyengar R. 1997.** Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14100-14104.
- 58 **Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J. 2000.** Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* **289**: 625-628.
- 59 **Cherniack NS, Altose MD. 1987.** Mechanisms of dyspnea. *Clin Chest Med* **8**: 207-214.
- 60 **Clarke JA, Daly MB, Marshall JM, Ead HW, Hennessy EM. 2000.** Quantitative studies of the vasculature of the carotid body in the chronically hypoxic rat. *Braz J Med Biol Res* **33**: 331-340.

- 61 **Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F. 2003.** Thromboxane A2-induced inhibition of voltage-gated K⁺ channels and pulmonary vasoconstriction: role of protein kinase C ζ . *Circ Res* **93**: 656-663.
- 62 **Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Tamargo J, Pérez-Vizcaíno F. 2005.** Postnatal maturational shift from PKC ζ and voltage-gated K⁺ channels to RhoA/Rho kinase in pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* **66**: 84-93.
- 63 **Cogolludo A, Moreno L, Frazziano G, Moral-Sanz J, Menéndez C, Castañeda J, González C, Villamor E, Pérez-Vizcaíno F. 2009.** Activation of neutral sphingomyelinase is involved in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Cardiovasc Res* **82**: 296-302.
- 64 **Comroe J. 1974.** *Physiology of respiration*, second edition edn., USA: Year book medical publishers.
- 65 **Conde SV, Obeso A, Rigual R, Monteiro EC, González C. 2006.** Function of the rat carotid body chemoreceptors in ageing. *J Neurochem* **99**: 711-723.
- 66 **Conde SV, Cáceres AI, Vicario I, Rocher A, Obeso A, González C. 2006.** An overview on the homeostasis of Ca²⁺ in chemoreceptor cells of the rabbit and rat carotid bodies. *Adv Exp Med Biol* **580**: 215-222.
- 67 **Conde SV, Obeso A, González C. 2007.** Low glucose effects on rat carotid body chemoreceptor cells' secretory responses and action potential frequency in the carotid sinus nerve. *J Physiol* **585**: 721-730.
- 68 **Conde SV, González C, Batuca JR, Monteiro EC, Obeso A. 2008.** An antagonistic interaction between A2B adenosine and D2 dopamine receptors modulates the function of rat carotid body chemoreceptor cells. *J Neurochem* **107**: 1369-1381.
- 69 **Conde SV, Ribeiro MJ, Obeso A, Rigual R, Monteiro EC, González C. 2012.** Chronic caffeine intake in adult rat inhibits carotid body sensitization produced by chronic sustained hypoxia but maintains intact chemoreflex output. *Mol Pharmacol* **82**: 1056-1065.
- 70 **Conde SV, Monteiro EC, Rigual R, Obeso A, González C. 2012.** Hypoxic intensity: a determinant for the contribution of ATP and adenosine to the genesis of carotid body chemosensory activity. *J Appl Physiol (1985)* **112**: 2002-2010.
- 71 **Connolly MJ, Prieto-Lloret J, Becker S, Ward JP, Aaronson PI. 2013.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the absence of pretone: essential role for intracellular Ca²⁺ release. *J Physiol* **591**: 4473-4498.
- 72 **Cooper CE, Brown GC. 2008.** The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J Bioenerg Biomembr* **40**: 533-539.
- 73 **Cooper DM. 2003.** Molecular and cellular requirements for the regulation of adenylate cyclases by calcium. *Biochem Soc Trans* **31**: 912-915.
- 74 **Cross AR, Jones OT. 1991.** Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta* **1057**: 281-298.
- 75 **Czyzyk-Krzeska MF, Bayliss DA, Lawson EE, Millhorn DE. 1992.** Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression in the rat carotid body by hypoxia. *J Neurochem* **58**: 1538-1546.
- 76 **Dallas ML, Scragg JL, Wyatt CN, Ross F, Hardie DG, Evans AM, Peers C. 2009.** Modulation of O₂ sensitive K⁽⁺⁾ channels by AMP-activated protein kinase. *Adv Exp Med Biol* **648**: 57-63.
- 77 **Dasso LL, Buckler KJ, Vaughan-Jones RD. 2000.** Interactions between hypoxia and hypercapnic acidosis on calcium signaling in carotid body type I cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**: L36-L42.
- 78 **Dauger S, Ferkdadjji L, Saumon G, Vardon G, Peuchmaur M, Gaultier C, Gallego J. 2003.** Neonatal exposure to 65% oxygen durably impairs lung architecture and breathing pattern in adult mice. *Chest* **123**: 530-538.

- 79 **De Castro F. 1928.** Sur la structure et l'innervation du sinus carotidien de l'homme et des mammifères: Nouveaux faits sur l'innervation et la fonction du glomus caroticum. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid* **25**: 330-380.
- 80 **Delpiano MA, Acker H. 1991.** Hypoxia increases the cyclic AMP content of the cat carotid body in vitro. *J Neurochem* **57**: 291-297.
- 81 **Dessauer CW, Tesmer JJ, Sprang SR, Gilman AG. 1999.** The interactions of adenylate cyclases with P-site inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* **20** : 205-210.
- 82 **Di BG, Scalzotto E, Mongillo M, Pozzan T. 2013.** Mitochondrial Ca(2)(+) uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels. *Cell Metab* **17**: 965-975.
- 83 **Dinger B, González C, Yoshizaki K, Fidone S. 1981.** [3H]Spiroperidol binding in normal and denervated carotid bodies. *Neurosci Lett* **21**: 51-55.
- 84 **Dipp M, Evans AM. 2001.** Cyclic ADP-ribose is the primary trigger for hypoxic pulmonary vasoconstriction in the rat lung in situ. *Circ Res* **89**: 77-83.
- 85 **Dipp M, Nye PC, Evans AM. 2001.** Hypoxic release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**: L318-L325.
- 86 **Dodge-Kafka KL, Soughayer J, Pare GC, Carlisle Michel JJ, Langeberg LK, Kapiloff MS, Scott JD. 2005.** The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* **437**: 574-578.
- 87 **Donnelly DF. 1996.** Chemoreceptor nerve excitation may not be proportional to catecholamine secretion. *J Appl Physiol* **81**: 657-664.
- 88 **Donnelly DF. 1997.** Are oxygen dependent K⁺ channels essential for carotid body chemo-transduction? *Respir Physiol* **110**: 211-218.
- 89 **Dvorakova M, Hohler B, Vollerthun R, Fischbach T, Kummer W. 2000.** Macrophages: a major source of cytochrome b558 in the rat carotid body. *Brain Res* **852**: 349-354.
- 90 **Erickson JT, Mayer C, Jawa A, Ling L, Olson EB, Jr., Vidruk EH, Mitchell GS, Katz DM. 1998.** Chemoafferent degeneration and carotid body hypoplasia following chronic hyperoxia in newborn rats. *J Physiol* **509 (Pt 2)**: 519-526.
- 91 **Evans AM, Mustard KJ, Wyatt CN, Peers C, Dipp M, Kumar P, Kinnear NP, Hardie DG. 2005.** Does AMP-activated protein kinase couple inhibition of mitochondrial oxidative phosphorylation by hypoxia to calcium signaling in O₂-sensing cells? *J Biol Chem* **280**: 41504-41511.
- 92 **Evans AM. 2006.** AMP-activated protein kinase underpins hypoxic pulmonary vasoconstriction and carotid body excitation by hypoxia in mammals. *Exp Physiol* **91**: 821-827.
- 93 **Evans AM, Hardie DG, Peers C, Mahmoud A. 2011.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms of oxygen-sensing. *Curr Opin Anaesthesiol* **24** : 13-20.
- 94 **Evans MA, Ward JP. 2009.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction--invited article. *Adv Exp Med Biol* **648**: 351-360.
- 95 **Eyzaguirre C, Zapata P. 1968.** The release of acetylcholine from carotid body tissues. Further study on the effects of acetylcholine and cholinergic blocking agents on the chemosensory discharge. *J Physiol* **195**: 589-607.
- 96 **Eyzaguirre C. 2007.** Electric synapses in the carotid body-nerve complex. *Respir Physiol Neurobiol* **157**: 116-122.
- 97 **Fadic R, Larrain C, Zapata P. 1991.** Thermal effects on ventilation in cats: participation of carotid body chemoreceptors. *Respir Physiol* **86**: 51-63.
- 98 **Fago A, Hundahl C, Dewilde S, Gilany K, Moens L, Weber RE. 2004.** Allosteric regulation and temperature dependence of oxygen binding in human neuroglobin and cytoglobin. Molecular mechanisms and physiological significance. *J Biol Chem* **279**: 44417-44426.

- 99 **Fago A, Hundahl C, Malte H, Weber RE. 2004.** Functional properties of neuroglobin and cytoglobin. Insights into the ancestral physiological roles of globins. *IUBMB Life* **56**: 689-696.
- 100 **Fesenko EE, Kolesnikov SS, Lyubarsky AL. 1985.** Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313**: 310-313.
- 101 **Fidone S, González C. 1982.** Catecholamine synthesis in rabbit carotid body in vitro. *J Physiol* **333**: 69-79.
- 102 **Fidone S, González C, Yoshizaki K. 1982.** Effects of hypoxia on catecholamine synthesis in rabbit carotid body in vitro. *J Physiol* **333**: 81-91.
- 103 **Fidone S, González C, Yoshizaki K. 1982.** Effects of low oxygen on the release of dopamine from the rabbit carotid body in vitro. *J Physiol* **333**: 93-110.
- 104 **Fidone SJ, González C. 1986.** Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. In: *Handbook of Physiology. The Respiratory System*. Fishman AP ed. 247-312.
- 105 **Fitzgerald R S. 1976.** Single fiber chemoreceptor responses of carotid and aortic bodies. In: *Morphology and mechanisms of chemoreceptors*. Paintal A S ed. Delhi: Vallabhshai patel chest institue university of Delhi.
- 106 **Fitzgerald RS, Shirahata M. 1997.** Systemic responses elicited by stimulating the carotid body: primary and secondary mechanisms. In: *The Carotid Body Chemoreceptors*. 171-191.
- 107 **Fitzgerald RS, Parks DC. 1971.** Effect of hypoxia on carotid chemoreceptor response to carbon dioxide in cats. *Respir Physiol* **12**: 218-229.
- 108 **Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL. 1996.** Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* **16**: 4604-4613.
- 109 **Forte LR, Bylund DB, Zahler WL. 1983.** Forskolin does not activate sperm adenylate cyclase. *Mol Pharmacol* **24**: 42-47.
- 110 **Frazziano G, Moreno L, Moral-Sanz J, Menéndez C, Escolano L, González C, Villamor E, Álvarez-Sala JL, Cogolludo AL, Pérez-Vizcaíno F. 2011.** Neutral sphingomyelinase, NADPH oxidase and reactive oxygen species. Role in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Cell Physiol* **226**: 2633-2640.
- 111 **Fuller DD, Bavis RW, Vidruk EH, Wang ZY, Olson EB, Jr., Bisgard GE, Mitchell GS. 2002.** Life-long impairment of hypoxic phrenic responses in rats following 1 month of developmental hyperoxia. *J Physiol* **538**: 947-955.
- 112 **Gallego-Martin T, Fernández-Martínez S, Rigual R, Obeso A, González C. 2012.** Effects of low glucose on carotid body chemoreceptor cell activity studied in cultures of intact organs and in dissociated cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **302**: C1128-C1140.
- 113 **Gallego R, Eyzaguirre C, Monti-Bloch L. 1979.** Thermal and osmotic responses of arterial receptors. *J Neurophysiol* **42**: 665-680.
- 114 **Ganfornina MD, López-Barneo J. 1991.** Single K⁺ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 2927-2930.
- 115 **Gauda EB. 2002.** Gene expression in peripheral arterial chemoreceptors. *Microsc Res Tech* **59**: 153-167.
- 116 **Gauda EB, Cristofalo E, Nunez J. 2007.** Peripheral arterial chemoreceptors and sudden infant death syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* **157**: 162-170.
- 117 **Geiszt M, Kopp JB, Varnai P, Leto TL. 2000.** Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8010-8014.
- 118 **Geng W, Wang Z, Zhang J, Reed BY, Pak CY, Moe OW. 2005.** Cloning and characterization of the human soluble adenylyl cyclase. *Am J Physiol Cell Physiol* **288**: C1305-C1316.
- 119 **Ghofrani HA, Reichenberger F, Kohstall MG, Mrosek EH, Seeger T, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F. 2004.** Sildenafil increased exercise capacity during hypoxia at

- low altitudes and at Mount Everest base camp: a randomized, double-blind, placebo-controlled crossover trial. *Ann Intern Med* **141**: 169-177.
- 120 Gille A, Seifert R. 2003. 2'(3')-O-(N-methylanthranilyl)-substituted GTP analogs: a novel class of potent competitive adenylyl cyclase inhibitors. *J Biol Chem* **278**: 12672-12679.
- 121 Gille A, Lushington GH, Mou TC, Doughty MB, Johnson RA, Seifert R. 2004. Differential inhibition of adenylyl cyclase isoforms and soluble guanylyl cyclase by purine and pyrimidine nucleotides. *J Biol Chem* **279**: 19955-19969.
- 122 Glasser SA, Domino KB, Lindgren L, Parcella P, Marshall C, Marshall BE. 1983. Pulmonary blood pressure and flow during atelectasis in the dog. *Anesthesiology* **58**: 225-231.
- 123 Gómez-Nino A, Agapito MT, Obeso A, González C. 2009. Effects of mitochondrial poisons on glutathione redox potential and carotid body chemoreceptor activity. *Respir Physiol Neurobiol* **165**: 104-111.
- 124 Gómez-Nino A, Obeso A, Baranda JA, Santo-Domingo J, López-López JR, González C. 2009. MaxiK potassium channels in the function of chemoreceptor cells of the rat carotid body. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**: C715-C722.
- 125 González-Martin MC, Vega-Agapito MV, Conde SV, Castañeda J, Bustamante R, Olea E, Pérez-Vizcaíno F, González C, Obeso A. 2011. Carotid body function and ventilatory responses in intermittent hypoxia. Evidence for anomalous brainstem integration of arterial chemoreceptor input. *J Cell Physiol* **226**: 1961-1969.
- 126 González C, Fidone S. 1977. Increased release of [(3)H]dopamine during low O(2) stimulation of rabbit carotid body in vitro. *Neurosci Lett* **6**: 95-99.
- 127 González C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. 1992. Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors. *Trends Neurosci* **15**: 146-153.
- 128 González C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. 1994. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev* **74**: 829-898.
- 129 González C, Sanz-Alfayate G, Agapito MT, Gómez-Nino A, Rocher A, Obeso A. 2002. Significance of ROS in oxygen sensing in cell systems with sensitivity to physiological hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* **132**: 17-41.
- 130 González C, Rocher A, Zapata P. 2003. [Arterial chemoreceptors: cellular and molecular mechanisms in the adaptative and homeostatic function of the carotid body]. *Rev Neurol* **36**: 239-254.
- 131 González C, Sanz-Alfayate G, Agapito MT, Obeso A. 2004. Effects of reducing agents on glutathione metabolism and the function of carotid body chemoreceptor cells. *Biol Chem* **385**: 265-274.
- 132 González C, Sanz-Alfayate G, Obeso A, Agapito MT. 2004. Role of glutathione redox state in oxygen sensing by carotid body chemoreceptor cells. *Methods Enzymol* **381**: 40-71.
- 133 González C, Agapito MT, Rocher A, González-Martin MC, Vega-Agapito V, Gómez-Nino A, Rigual R, Castañeda J, Obeso A. 2007. Chemoreception in the context of the general biology of ROS. *Respir Physiol Neurobiol* **157**: 30-44.
- 134 González C, Vaquero LM, López-López JR, Pérez-García MT. 2009. Oxygen-sensitive potassium channels in chemoreceptor cell physiology: making a virtue of necessity. *Ann N Y Acad Sci* **1177**: 82-88.
- 135 González C, Agapito MT, Rocher A, Gómez-Nino A, Rigual R, Castañeda J, Conde SV, Obeso A. 2010. A revisit to O₂ sensing and transduction in the carotid body chemoreceptors in the context of reactive oxygen species biology. *Respir Physiol Neurobiol* **174**: 317-330.
- 136 González C. 2006. Respuestas fisiológicas a la hipoxia. In: *Interacción cardiopulmonar y transporte gaseoso*. Pino J.M, García Río F BJA eds.

- 137 **González Martín M. 2008.** *Efectos de la hipoxia crónica sostenida e intermitente. Modelos de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y del síndrome de apnea del sueño humanos.* Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.
- 138 **Gorecka D, Sliwinski P, Palasiewicz G, Pachocki R, Zielinski J. 2003.** Effects of almitrine bismesylate on arterial blood gases in patients with chronic obstructive pulmonary disease and moderate hypoxaemia: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Respiration* **70**: 275-283.
- 139 **Greengard P. 1978.** Phosphorylated proteins as physiological effectors. *Science* **199**: 146-152.
- 140 **Griffith OW. 1980.** Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* **106**: 207-212.
- 141 **Hagen TM, Liu J, Lykkesfeldt J, Wehr CM, Ingersoll RT, Vinarsky V, Bartholomew JC, Ames BN. 2002.** Feeding acetyl-L-carnitine and lipoic acid to old rats significantly improves metabolic function while decreasing oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 1870-1875.
- 142 **Halliwell B, Gutteridge J. 2007.** *Free radicals in biology and medicine*, Biosciences oxford edn., New York.
- 143 **Hanbauer I, Karoum F, Hellstrom S, Lahiri S. 1981.** Effects of hypoxia lasting up to one month on the catecholamine content in rat carotid body. *Neuroscience* **6**: 81-86.
- 144 **Hanoune J, Defer N. 2001.** Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 145-174.
- 145 **Hanson M, Kumar P. 1994.** Chemoreceptor function in the fetus and neonate. *Adv Exp Med Biol* **360**: 99-108.
- 146 **Haouzi P, Bell H, Van de Louw A. 2011.** Hypoxia-induced arterial chemoreceptor stimulation and hydrogen sulfide: too much or too little? *Respir Physiol Neurobiol* **179**: 97-102.
- 147 **Hardie DG. 2008.** AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 4**: S7-12.
- 148 **Hartnett ME, Penn JS. 2012.** Mechanisms and management of retinopathy of prematurity. *N Engl J Med* **367**: 2515-2526.
- 149 **Haslam RJ, Davidson MM, Desjardins JV. 1978.** Inhibition of adenylate cyclase by adenosine analogues in preparations of broken and intact human platelets. Evidence for the unidirectional control of platelet function by cyclic AMP. *Biochem J* **176**: 83-95.
- 150 **Hayes P, Knaus UG. 2013.** Balancing reactive oxygen species in the epigenome: NADPH oxidases as target and perpetrator. *Antioxid Redox Signal* **18**: 1937-1945.
- 151 **He L, Chen J, Dinger B, Sanders K, Sundar K, Hoidal J, Fidone S. 2002.** Characteristics of carotid body chemosensitivity in NADPH oxidase-deficient mice. *Am J Physiol Cell Physiol* **282**: C27-C33.
- 152 **He L, Dinger B, Sanders K, Hoidal J, Obeso A, Stensaas L, Fidone S, González C. 2005.** Effect of p47phox gene deletion on ROS production and oxygen sensing in mouse carotid body chemoreceptor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **289**: L916-L924.
- 153 **He L, Liu X, Chen J, Dinger B, Stensaas L, Fidone S. 2010.** Modulation of chronic hypoxia-induced chemoreceptor hypersensitivity by NADPH oxidase subunits in rat carotid body. *J Appl Physiol* **108**: 1304-1310.
- 154 **Hempleman SC. 1996.** Increased calcium current in carotid body glomus cells following in vivo acclimatization to chronic hypoxia. *J Neurophysiol* **76**: 1880-1886.
- 155 **Hess KC, Jones BH, Marquez B, Chen Y, Ord TS, Kamenetsky M, Miyamoto C, Zippin JH, Kopf GS, Suarez SS, Levin LR, Williams CJ, Buck J, Moss SB. 2005.** The "soluble" adenylyl cyclase in sperm mediates multiple signaling events required for fertilization. *Dev Cell* **9**: 249-259.
- 156 **Heymans C, Bouckaert J, Dautrebande L. 1930.** Sinus carotidien et réflexes respiratoires, II. Influences respiratoires réflexes de l'acidose, de l'alcalose, de l'anhydride carbonique, de

- l'ion hydrogène et de l'anoxémie: Sinus carotidiens et échanges respiratoires dans les poumons et au de la des poumons. 400-408.
- 157 **Hidaka H, Watanabe M, Kobayashi R. 1991.** Properties and use of H-series compounds as protein kinase inhibitors. *Methods Enzymol* **201**: 328-339.
- 158 **Hlastala MP, Glenny RW. 1999.** Vascular structure determines pulmonary blood flow distribution. *News Physiol Sci* **14**: 182-186.
- 159 **Holz GG, Kang G, Harbeck M, Roe MW, Chepurny OG. 2006.** Cell physiology of cAMP sensor Epac. *J Physiol* **577**: 5-15.
- 160 **Hsu PC, Liu MY, Hsu CC, Chen LY, Guo YL. 1998.** Effects of vitamin E and/or C on reactive oxygen species-related lead toxicity in the rat sperm. *Toxicology* **128**: 169-179.
- 161 **Iizuka T, Kanegasaki S, Makino R, Tanaka T, Ishimura Y. 1985.** Studies on neutrophil b-type cytochrome in situ by low temperature absorption spectroscopy. *J Biol Chem* **260**: 12049-12053.
- 162 **Irsigler GB, Stafford MJ, Severinghaus JW. 1980.** Relationship of CSF pH, O₂, and CO₂ responses in metabolic acidosis and alkalosis in humans. *J Appl Physiol* **48**: 355-361.
- 163 **Iturriaga R, Lahiri S, Mokashi A. 1991.** Carbonic anhydrase and chemoreception in the cat carotid body. *Am J Physiol* **261**: C565-C573.
- 164 **Iturriaga R, Alcayaga J, Zapata P. 1996.** Dissociation of hypoxia-induced chemosensory responses and catecholamine efflux in cat carotid body superfused in vitro. *J Physiol* **497 (Pt 2)**: 551-564.
- 165 **Iturriaga R, Alcayaga J. 2004.** Neurotransmission in the carotid body: transmitters and modulators between glomus cells and petrosal ganglion nerve terminals. *Brain Res Brain Res Rev* **47**: 46-53.
- 166 **Iturriaga R, Alcayaga J, González C. 2009.** Neurotransmitters in carotid body function: the case of dopamine--invited article. *Adv Exp Med Biol* **648**: 137-143.
- 167 **Iwami G, Kawabe J, Ebina T, Cannon PJ, Homcy CJ, Ishikawa Y. 1995.** Regulation of adenylyl cyclase by protein kinase A. *J Biol Chem* **270**: 12481-12484.
- 168 **Iwatsubo K, Minamisawa S, Tsunematsu T, Nakagome M, Toya Y, Tomlinson JE, Umemura S, Scarborough RM, Levy DE, Ishikawa Y. 2004.** Direct inhibition of type 5 adenylyl cyclase prevents myocardial apoptosis without functional deterioration. *J Biol Chem* **279**: 40938-40945.
- 169 **Jackson A, Nurse C. 1995.** Plasticity in cultured carotid body chemoreceptors: environmental modulation of GAP-43 and neurofilament. *J Neurobiol* **26**: 485-496.
- 170 **Jacobowitz O, Iyengar R. 1994.** Phorbol ester-induced stimulation and phosphorylation of adenylyl cyclase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** : 10630-10634.
- 171 **Jaiswal BS, Conti M. 2001.** Identification and functional analysis of splice variants of the germ cell soluble adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **276**: 31698-31708.
- 172 **Jaiswal BS, Conti M. 2003.** Calcium regulation of the soluble adenylyl cyclase expressed in mammalian spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10676-10681.
- 173 **Jelic S, Le Jemtel TH. 2008.** Inflammation, oxidative stress, and the vascular endothelium in obstructive sleep apnea. *Trends Cardiovasc Med* **18**: 253-260.
- 174 **Jelkmann W. 1992.** Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* **72**: 449-489.
- 175 **Kaab S, Miguel-Velado E, López-López JR, Pérez-García MT. 2005.** Down regulation of Kv3.4 channels by chronic hypoxia increases acute oxygen sensitivity in rabbit carotid body. *J Physiol* **566**: 395-408.
- 176 **Kang G, Joseph JW, Chepurny OG, Monaco M, Wheeler MB, Bos JL, Schwede F, Genieser HG, Holz GG. 2003.** Epac-selective cAMP analog 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP as a

- stimulus for Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and exocytosis in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **278**: 8279-8285.
- 177 **Kang G, Leech CA, Chepurny OG, Coetzee WA, Holz GG. 2008.** Role of the cAMP sensor Epac as a determinant of KATP channel ATP sensitivity in human pancreatic beta-cells and rat INS-1 cells. *J Physiol* **586**: 1307-1319.
- 178 **Kashima Y, Miki T, Shibasaki T, Ozaki N, Miyazaki M, Yano H, Seino S. 2001.** Critical role of cAMP-GEFII--Rim2 complex in incretin-potentiated insulin secretion. *J Biol Chem* **276**: 46046-46053.
- 179 **Kim D, Cavanaugh EJ, Kim I, Carroll JL. 2009.** Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells. *J Physiol* **587**: 2963-2975.
- 180 **Kim D, Papreck JR, Kim I, Donnelly DF, Carroll JL. 2011.** Changes in oxygen sensitivity of TASK in carotid body glomus cells during early postnatal development. *Respir Physiol Neurobiol* **177**: 228-235.
- 181 **Kim I, Yang D, Carroll JL, Donnelly DF. 2013.** Perinatal hyperoxia exposure impairs hypoxia-induced depolarization in rat carotid body glomus cells. *Respir Physiol Neurobiol* **188**: 9-14.
- 182 **Knapowski J, Wiczorowska-Tobis K, Witowski J. 2002.** Pathophysiology of ageing. *J Physiol Pharmacol* **53**: 135-146.
- 183 **Krupinski J, Coussen F, Bakalyar HA, Tang WJ, Feinstein PG, Orth K, Slaughter C, Reed RR, Gilman AG. 1989.** Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science* **244**: 1558-1564.
- 184 **Kumar GK, Rai V, Sharma SD, Ramakrishnan DP, Peng YJ, Souvannakitti D, Prabhakar NR. 2006.** Chronic intermittent hypoxia induces hypoxia-evoked catecholamine efflux in adult rat adrenal medulla via oxidative stress. *J Physiol* **575**: 229-239.
- 185 **Kumar P. 2009.** Systemic effects resulting from carotid body stimulation-invited article. *Adv Exp Med Biol* **648**: 223-233.
- 186 **Kumar S, Kostin S, Flacke JP, Reusch HP, Ladilov Y. 2009.** Soluble adenylyl cyclase controls mitochondria-dependent apoptosis in coronary endothelial cells. *J Biol Chem* **284**: 14760-14768.
- 187 **Kummer W, Acker H. 1995.** Immunohistochemical demonstration of four subunits of neutrophil NAD(P)H oxidase in type I cells of carotid body. *J Appl Physiol* **78**: 1904-1909.
- 188 **Lahiri S, Delaney RG. 1976.** The nature of response of single chemoreceptor fibers of carotid body to changes in arterial PO₂ and PCO₂ -H⁺. In: *Morphology and mechanisms of chemoreceptors*. A.S Paintal ed. Delhi, India: 18-26.
- 189 **Lahiri S, DeLaney RG. 1975.** Stimulus interaction in the responses of carotid body chemoreceptor single afferent fibers. *Respir Physiol* **24** : 249-266.
- 190 **Laidler P, Kay JM. 1975.** The effect of chronic hypoxia on the number and nuclear diameter of type I cells in the carotid bodies of rats. *Am J Pathol* **79**: 311-320.
- 191 **Lassegue B, Griendling KK. 2010.** NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**: 653-661.
- 192 **Lee PJ, Jiang BH, Chin BY, Iyer NV, Alam J, Semenza GL, Choi AM. 1997.** Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem* **272**: 5375-5381.
- 193 **Lee YM, Kim BJ, Chun YS, So I, Choi H, Kim MS, Park JW. 2006.** NOX4 as an oxygen sensor to regulate TASK-1 activity. *Cell Signal* **18**: 499-507.
- 194 **Li Q, Sun B, Wang X, Jin Z, Zhou Y, Dong L, Jiang LH, Rong W. 2010.** A crucial role for hydrogen sulfide in oxygen sensing via modulating large conductance calcium-activated potassium channels. *Antioxid Redox Signal* **12** : 1179-1189.

- 195 Li Y, Asuri S, Rebhun JF, Castro AF, Parnavitana NC, Quilliam LA. 2006. The RAP1 guanine nucleotide exchange factor Epac2 couples cyclic AMP and Ras signals at the plasma membrane. *J Biol Chem* **281**: 2506-2514.
- 196 Lim J, Yang C, Hong SJ, Kim KS. 2000. Regulation of tyrosine hydroxylase gene transcription by the cAMP-signaling pathway: involvement of multiple transcription factors. *Mol Cell Biochem* **212**: 51-60.
- 197 Ling L, Olson EB, Jr., Vidruk EH, Mitchell GS. 1997. Integrated phrenic responses to carotid afferent stimulation in adult rats following perinatal hyperoxia. *J Physiol* **500 (Pt 3)**: 787-796.
- 198 Ling L, Olson EB, Jr., Vidruk EH, Mitchell GS. 1997. Phrenic responses to isocapnic hypoxia in adult rats following perinatal hyperoxia. *Respir Physiol* **109**: 107-116.
- 199 Ling L, Olson EB, Jr., Vidruk EH, Mitchell GS. 1997. Developmental plasticity of the hypoxic ventilatory response. *Respir Physiol* **110**: 261-268.
- 200 Ling L, Olson EB, Jr., Vidruk EH, Mitchell GS. 1998. Slow recovery of impaired phrenic responses to hypoxia following perinatal hyperoxia in rats. *J Physiol* **511 (Pt 2)**: 599-603.
- 201 Liu G, Jacobo SM, Hilliard N, Hockerman GH. 2006. Differential modulation of Cav1.2 and Cav1.3-mediated glucose-stimulated insulin secretion by cAMP in INS-1 cells: distinct roles for exchange protein directly activated by cAMP 2 (Epac2) and protein kinase A. *J Pharmacol Exp Ther* **318**: 152-160.
- 202 Liu M, Large WA, Albert AP. 2005. Stimulation of beta-adrenoceptors inhibits store-operated channel currents via a cAMP-dependent protein kinase mechanism in rabbit portal vein myocytes. *J Physiol* **562**: 395-406.
- 203 Liu X, He L, Dinger B, Stensaas L, Fidone S. 2013. Sustained exposure to cytokines and hypoxia enhances excitability of oxygen-sensitive type I cells in rat carotid body: correlation with the expression of HIF-1alpha protein and adrenomedullin. *High Alt Med Biol* **14**: 53-60.
- 204 Lloyd BB, Cunningham DJC, Goode RC. 1960. Depression of hypoxic hyperventilation in man by sudden inspiration of carbon monoxide. In: *Arterial Chemoreceptors*. Torrance RW ed. Oxford: Blackwell: 145-150.
- 205 Lochner A, Moolman JA. 2006. The many faces of H89: a review. *Cardiovasc Drug Rev* **24**: 261-274.
- 206 López-Barneo J, López-López JR, Urena J, González C. 1988. Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* **241**: 580-582.
- 207 López-Barneo J, Pardal R, Ortega-Saenz P, Duran R, Villadiego J, Toledo-Aral JJ. 2009. The neurogenic niche in the carotid body and its applicability to antiparkinsonian cell therapy. *J Neural Transm* **116**: 975-982.
- 208 López-López J, González C, Urena J, López-Barneo J. 1989. Low pO₂ selectively inhibits K channel activity in chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *J Gen Physiol* **93**: 1001-1015.
- 209 López-López JR, González C. 1992. Time course of K⁺ current inhibition by low oxygen in chemoreceptor cells of adult rabbit carotid body. Effects of carbon monoxide. *FEBS Lett* **299**: 251-254.
- 210 López-López JR, De Luis DA, González C. 1993. Properties of a transient K⁺ current in chemoreceptor cells of rabbit carotid body. *J Physiol* **460**: 15-32.
- 211 Lu W, Wang J, Peng G, Shimoda LA, Sylvester JT. 2009. Knockdown of stromal interaction molecule 1 attenuates store-operated Ca²⁺ entry and Ca²⁺ responses to acute hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **297**: L17-L25.
- 212 Lu Y, Whiteis CA, Sluka KA, Chapleau MW, Abboud FM. 2013. Responses of glomus cells to hypoxia and acidosis are uncoupled, reciprocal and linked to ASIC3 expression: selectivity of chemosensory transduction. *J Physiol* **591**: 919-932.

- 213 **Ludwig C. 1847.** Beiträge zur Kenntnis des Einflusses der Respirationsbewegungen auf den Blutlauf im Aortensysteme. *Arch Anat Physiol Wiss Med* 242-302.
- 214 **Madden JA, Vadula MS, Kurup VP. 1992.** Effects of hypoxia and other vasoactive agents on pulmonary and cerebral artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 263: L384-L393.
- 215 **Maines MD. 1997.** The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554.
- 216 **Marshall BE, Hanson CW, Frasch F, Marshall C. 1994.** Role of hypoxic pulmonary vasoconstriction in pulmonary gas exchange and blood flow distribution. 2. Pathophysiology. *Intensive Care Med* 20: 379-389.
- 217 **Marshall C, Marshall BE. 1983.** Influence of perfusate PO₂ on hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *Circ Res* 52: 691-696.
- 218 **Martin A, Janigian D, Shukitt-Hale B, Prior RL, Joseph JA. 1999.** Effect of vitamin E intake on levels of vitamins E and C in the central nervous system and peripheral tissues: implications for health recommendations. *Brain Res* 845: 50-59.
- 219 **McCloskey DI. 1968.** Carbon dioxide and the carotid body. In: *Arterial Chemoreceptors*. R.W.Torrance ed. Oxford, UK: Blackwell: 279-295.
- 220 **McConnachie G, Langeberg LK, Scott JD. 2006.** AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol Med* 12: 317-323.
- 221 **McDonald DM. 1981.** Peripheral chemoreceptors: structure-function relationships of the carotid body. In: *Regulation of Breathing Lung Biol Health Dis*. Hornbein TF ed. New York: 105-320.
- 222 **Michelakis ED, Thebaud B, Weir EK, Archer SL. 2004.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O₂-sensitive K⁺ channels by a mitochondrial O₂-sensor in resistance artery smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol* 37: 1119-1136.
- 223 **Moini H, Packer L, Saris NE. 2002.** Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 182: 84-90.
- 224 **Monge C, Leon-Velarde F. 1991.** Physiological adaptation to high altitude: oxygen transport in mammals and birds. *Physiol Rev* 71: 1135-1172.
- 225 **Montero O, Ramírez M, Sánchez-Guijo A, González C. 2012.** Determination of lipoic acid, Trolox methyl ether and tocopherols in human plasma by liquid-chromatography and ion-trap tandem mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* 26: 1228-1233.
- 226 **Montero SA, Yarkov A, Lemus M, Mendoza H, Valles V, de Álvarez-Buylla ER, Álvarez-Buylla R. 2003.** Enhancing effect of vasopressin on the hyperglycemic response to carotid body chemoreceptor stimulation. Role of metabolic variables. *Adv Exp Med Biol* 536: 95-107.
- 227 **Moreno L, Moral-Sanz J, Morales-Cano D, Barreira B, Moreno E, Ferrarini A, Pandolfi R, Rupérez FJ, Cortijo J, Sánchez-Luna M, Villamor E, Pérez-Vizcaíno F, Cogolludo A. 2013.** Ceramide mediates acute oxygen sensing in vascular tissues. *Antioxid Redox Signal*.
- 228 **Morikawa T, Kajimura M, Nakamura T, Hishiki T, Nakanishi T, Yukutake Y, Nagahata Y, Ishikawa M, Hattori K, Takenouchi T, Takahashi T, Ishii I, Matsubara K, Kabe Y, Uchiyama S, Nagata E, Gadalla MM, Snyder SH, Suematsu M. 2012.** Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 1293-1298.
- 229 **Motley HL, Cournand A., Werko L, Himmelstein A, Dresdale D. 1947.** The influence of short periods of induced acute anoxia upon pulmonary artery pressures in man. *Am J Physiol* 150: 315-320.
- 230 **Mulligan E, Lahiri S, Storey BT. 1981.** Carotid body O₂ chemoreception and mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 51: 438-446.
- 231 **Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball MK, Schumacker PT. 2011.** Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels. *Mol Cell Biol* 31: 3531-3545.

- 232 **Murray AJ. 2008.** Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal* **1**: re4.
- 233 **Nakamura T, Gold GH. 1987.** A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* **325**: 442-444.
- 234 **Nanduri J, Makarenko V, Reddy VD, Yuan G, Pawar A, Wang N, Khan SA, Zhang X, Kinsman B, Peng YJ, Kumar GK, Fox AP, Godley LA, Semenza GL, Prabhakar NR. 2012.** Epigenetic regulation of hypoxic sensing disrupts cardiorespiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 2515-2520.
- 235 **Nattie E. 1999.** CO₂, brainstem chemoreceptors and breathing. *Prog Neurobiol* **59**: 299-331.
- 236 **Ng LC, Ramduny D, Airey JA, Singer CA, Keller PS, Shen XM, Tian H, Valencik M, Hume JR. 2010.** Orai1 interacts with STIM1 and mediates capacitative Ca²⁺ entry in mouse pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **299**: C1079-C1090.
- 237 **Niimura M, Miki T, Shibasaki T, Fujimoto W, Iwanaga T, Seino S. 2009.** Critical role of the N-terminal cyclic AMP-binding domain of Epac2 in its subcellular localization and function. *J Cell Physiol* **219**: 652-658.
- 238 **Nohl H, Gille L, Staniek K. 2005.** Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria. *Biochem Pharmacol* **69**: 719-723.
- 239 **Norris ML, Millhorn DE. 1995.** Hypoxia-induced protein binding to O₂-responsive sequences on the tyrosine hydroxylase gene. *J Biol Chem* **270**: 23774-23779.
- 240 **Nunes AR, Monteiro EC, Johnson SM, Gauda EB. 2009.** Bicarbonate-regulated soluble adenylyl cyclase (sAC) mRNA expression and activity in peripheral chemoreceptors. *Adv Exp Med Biol* **648**: 235-241.
- 241 **Nunes AR, Holmes AP, Sample V, Kumar P, Cann MJ, Monteiro EC, Zhang J, Gauda EB. 2013.** Bicarbonate-sensitive soluble and transmembrane adenylyl cyclases in peripheral chemoreceptors. *Respir Physiol Neurobiol* **188**: 83-93.
- 242 **Nurse CA. 2010.** Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms at peripheral arterial chemoreceptors. *Exp Physiol* **95**: 657-667.
- 243 **Nurse CA, Piskuric NA. 2013.** Signal processing at mammalian carotid body chemoreceptors. *Semin Cell Dev Biol* **24**: 22-30.
- 244 **Nye PC, Hanson MA, Torrance RW. 1981.** The effect on breathing of abruptly stopping carotid body discharge. *Respir Physiol* **46**: 309-326.
- 245 **O'Donovan DJ, Fernandes CJ. 2000.** Mitochondrial glutathione and oxidative stress: implications for pulmonary oxygen toxicity in premature infants. *Mol Genet Metab* **71**: 352-358.
- 246 **Obeso A, Rocher A, Herreros B, González C. 1997.** Oxygen consumption and energy metabolism of the carotid body. In: *The Carotid Body Chemoreceptors*. González C ed. NY: Springer-Verlag, 31-45.
- 247 **Obeso A, González C, Rocher A. 2006.** Mecanismos de quimiorrecepción en el cuerpo carotídeo. In: *Estudio de la función respiratoria*. Pino García J, García Río F eds.
- 248 **Obeso A, Almaraz L, González C. 1985.** Correlation between adenosine triphosphate levels, dopamine release and electrical activity in the carotid body: support for the metabolic hypothesis of chemoreception. *Brain Res* **348**: 64-68.
- 249 **Obeso A, Almaraz L, González C. 1986.** Effects of 2-deoxy-D-glucose on in vitro cat carotid body. *Brain Res* **371**: 25-36.
- 250 **Obeso A, Rocher A, Fidone S, González C. 1992.** The role of dihydropyridine-sensitive Ca²⁺ channels in stimulus-evoked catecholamine release from chemoreceptor cells of the carotid body. *Neuroscience* **47**: 463-472.
- 251 **Olschewski A, Hong Z, Nelson DP, Weir EK. 2002.** Graded response of K⁺ current, membrane potential, and [Ca²⁺]_i to hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **283**: L1143-L1150.

- 252 Olson KR. 2013. Hydrogen sulfide as an oxygen sensor. *Clin Chem Lab Med* **51**: 623-632.
- 253 Ortega-Saenz P, Pascual A, Gómez-Díaz R, López-Barneo J. 2006. Acute oxygen sensing in heme oxygenase-2 null mice. *J Gen Physiol* **128**: 405-411.
- 254 Osipenko ON, Tate RJ, Gurney AM. 2000. Potential role for kv3.1b channels as oxygen sensors. *Circ Res* **86**: 534-540.
- 255 Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, Sunaga Y, Yano H, Matsuura Y, Iwanaga T, Takai Y, Seino S. 2000. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* **2**: 805-811.
- 256 Pagano A, Barazzone-Argiroffo C. 2003. Alveolar cell death in hyperoxia-induced lung injury. *Ann N Y Acad Sci* **1010**: 405-416.
- 257 Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* **70**: 158-169.
- 258 Palmer LA, Semenza GL, Stoler MH, Johns RA. 1998. Hypoxia induces type II NOS gene expression in pulmonary artery endothelial cells via HIF-1. *Am J Physiol* **274**: L212-L219.
- 259 Pardal R, López-Barneo J. 2002. Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nat Neurosci* **5**: 197-198.
- 260 Pardal R, Ortega-Saenz P, Duran R, López-Barneo J. 2007. Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* **131**: 364-377.
- 261 Park SJ, Chun YS, Park KS, Kim SJ, Choi SO, Kim HL, Park JW. 2009. Identification of subdomains in NADPH oxidase-4 critical for the oxygen-dependent regulation of TASK-1 K⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol* **297**: C855-C864.
- 262 Park WS, Firth AL, Han J, Ko EA. 2010. Patho-, physiological roles of voltage-dependent K⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Smooth Muscle Res* **46**: 89-105.
- 263 Parkos CA, Dinauer MC, Walker LE, Allen RA, Jesaitis AJ, Orkin SH. 1988. Primary structure and unique expression of the 22-kilodalton light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 3319-3323.
- 264 Patterson AJ, Xiao D, Xiong F, Dixon B, Zhang L. 2012. Hypoxia-derived oxidative stress mediates epigenetic repression of PKCepsilon gene in foetal rat hearts. *Cardiovasc Res* **93**: 302-310.
- 265 Peace AG, Shewan DA. 2011. New perspectives in cyclic AMP-mediated axon growth and guidance: The emerging epoch of Epac. *Brain Res Bull* **84**: 280-288.
- 266 Peers C, Green FK. 1991. Inhibition of Ca(2+)-activated K⁺ currents by intracellular acidosis in isolated type I cells of the neonatal rat carotid body. *J Physiol* **437**: 589-602.
- 267 Peers C, Kemp PJ. 2001. Acute oxygen sensing: diverse but convergent mechanisms in airway and arterial chemoreceptors. *Respir Res* **2**: 145-149.
- 268 Peng YJ, Nanduri J, Yuan G, Wang N, Deneris E, Pendyala S, Natarajan V, Kumar GK, Prabhakar NR. 2009. NADPH oxidase is required for the sensory plasticity of the carotid body by chronic intermittent hypoxia. *J Neurosci* **29**: 4903-4910.
- 269 Peng YJ, Nanduri J, Raghuraman G, Souvannakitti D, Gadalla MM, Kumar GK, Snyder SH, Prabhakar NR. 2010. H₂S mediates O₂ sensing in the carotid body. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 10719-10724.
- 270 Pepper DR, Landauer RC, Kumar P. 1995. Postnatal development of CO₂-O₂ interaction in the rat carotid body in vitro. *J Physiol* **485** (Pt 2): 531-541.
- 271 Pérez-García MT, Almaraz L, González C. 1990. Effects of different types of stimulation on cyclic AMP content in the rabbit carotid body: functional significance. *J Neurochem* **55**: 1287-1293.
- 272 Pérez-García MT, Almaraz L, González C. 1991. Cyclic AMP modulates differentially the release of dopamine induced by hypoxia and other stimuli and increases dopamine synthesis in the rabbit carotid body. *J Neurochem* **57**: 1992-2000.

- 273 Pérez-García MT, Obeso A, López-López JR, Herreros B, González C. 1992. Characterization of cultured chemoreceptor cells dissociated from adult rabbit carotid body. *Am J Physiol* **263**: C1152-C1159.
- 274 Pérez-García MT, López-López JR, González C. 1999. Kvbeta1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O₂ sensitivity to kv4.2 but not to Shaker channels. *J Gen Physiol* **113**: 897-907.
- 275 Pérez García M, González C. 1997. Mechanisms of sensory transduction in chemoreceptor cells: The role of second messengers. In: *The carotid body chemoreceptors*. González C ed. New York: 79-92.
- 276 Pflüger E. 1868. Ueber die ursacheder athembewegungen, sowie der dyspnoë and apnoë. *Pflugers Arch Gesamte Physiol Meschen Tiere* **1**: 61-106.
- 277 Platoshyn O, Brevnova EE, Burg ED, Yu Y, Remillard CV, Yuan JX. 2006. Acute hypoxia selectively inhibits KCNA5 channels in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**: C907-C916.
- 278 Post JM, Hume JR, Archer SL, Weir EK. 1992. Direct role for potassium channel inhibition in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* **262**: C882-C890.
- 279 Prabhakar NR, Dinerman JL, Agani FH, Snyder SH. 1995. Carbon monoxide: a role in carotid body chemoreception. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92** : 1994-1997.
- 280 Prabhakar NR. 2012. Carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H₂S) in hypoxic sensing by the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* **184**: 165-169.
- 281 Prasad M, Fearon IM, Zhang M, Laing M, Vollmer C, Nurse CA. 2001. Expression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits in rat carotid body afferent neurones: role in chemosensory signalling. *J Physiol* **537**: 667-677.
- 282 Prieto-Lloret J, Cáceres AI, Obeso A, Rocher A, Rigual R, Agapito MT, Bustamante R, Castañeda J, Pérez-García MT, López-López JR, González C. 2004. Ventilatory responses and carotid body function in adult rats perinatally exposed to hyperoxia. *J Physiol* **554**: 126-144.
- 283 Prieto Lloret J. 2005. *Hiperoxia perinatal y respuesta del cuerpo carotídeo y de las arterias pulmonares a la hipoxia. Función del cuerpo carotídeo en knockouts para receptores NK1 y D2*. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid.
- 284 Quintero M, González-Martin MC, Vega-Agapito V, González C, Obeso A, Farre R, Agapito T, Yubero S. 2013. The effects of intermittent hypoxia on redox status, NF-kappaB activation, and plasma lipid levels are dependent on the lowest oxygen saturation. *Free Radic Biol Med* **65**: 1143-1154.
- 285 Rajanikant GK, Zemke D, Senut MC, Frenkel MB, Chen AF, Gupta R, Majid A. 2007. Carnosine is neuroprotective against permanent focal cerebral ischemia in mice. *Stroke* **38**: 3023-3031.
- 286 Ramírez M, Almaraz L, González C, Rocher A. 2012. Cyclic AMP and Epac contribute to the genesis of the positive interaction between hypoxia and hypercapnia in the carotid body. *Adv Exp Med Biol* **758**: 215-223.
- 287 Rampersad SN, Ovens JD, Huston E, Umana MB, Wilson LS, Netherton SJ, Lynch MJ, Baillie GS, Houslay MD, Maurice DH. 2010. Cyclic AMP phosphodiesterase 4D (PDE4D) Tethers EPAC1 in a vascular endothelial cadherin (VE-Cad)-based signaling complex and controls cAMP-mediated vascular permeability. *J Biol Chem* **285**: 33614-33622.
- 288 Rausch SM, Whipp BJ, Wasserman K, Huszczuk A. 1991. Role of the carotid bodies in the respiratory compensation for the metabolic acidosis of exercise in humans. *J Physiol* **444**: 567-578.
- 289 Rehmann H. 2013. Epac-inhibitors: facts and artefacts. *Sci Rep* **3**: 3032.
- 290 Renstrom E, Eliasson L, Rorsman P. 1997. Protein kinase A-dependent and -independent stimulation of exocytosis by cAMP in mouse pancreatic B-cells. *J Physiol* **502 (Pt 1)**: 105-118.

- 291 **Richalet JP, Gratadour P, Robach P, Pham I, Dechaux M, Joncquiert-Latarjet A, Mollard P, Brugniaux J, Cornolo J. 2005.** Sildenafil inhibits altitude-induced hypoxemia and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **171**: 275-281.
- 292 **Rico AJ, Prieto-Lloret J, González C, Rigual R. 2005.** Hypoxia and acidosis increase the secretion of catecholamines in the neonatal rat adrenal medulla: an in vitro study. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**: C1417-C1425.
- 293 **Riesco-Fagundo AM, Pérez-García MT, González C, López-López JR. 2001.** O₂ modulates large-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels of rat chemoreceptor cells by a membrane-restricted and CO-sensitive mechanism. *Circ Res* **89**: 430-436.
- 294 **Rigual R, González E, Fidone S, González C. 1984.** Effects of low pH on synthesis and release of catecholamines in the cat carotid body in vitro. *Brain Res* **309**: 178-181.
- 295 **Rigual R, Iniguez C, Carreres J, González C. 1985.** Carbonic anhydrase in the carotid body and the carotid sinus nerve. *Histochemistry* **82**: 577-580.
- 296 **Rigual R, González E, González C, Fidone S. 1986.** Synthesis and release of catecholamines by the cat carotid body in vitro: effects of hypoxic stimulation. *Brain Res* **374**: 101-109.
- 297 **Rigual R, López-López JR, González C. 1991.** Release of dopamine and chemoreceptor discharge induced by low pH and high PCO₂ stimulation of the cat carotid body. *J Physiol* **433**: 519-531.
- 298 **Rigual R, Rico AJ, Prieto-Lloret J, De FC, González C, Donnelly DF. 2002.** Chemoreceptor activity is normal in mice lacking the NK1 receptor. *Eur J Neurosci* **16**: 2078-2084.
- 299 **Rocher A, Obeso A, Herreros B, González C. 1988.** Activation of the release of dopamine in the carotid body by veratridine. Evidence for the presence of voltage-dependent Na⁺ channels in type I cells. *Neurosci Lett* **94**: 274-278.
- 300 **Rocher A, Obeso A, González C, Herreros B. 1991.** Ionic mechanisms for the transduction of acidic stimuli in rabbit carotid body glomus cells. *J Physiol* **433**: 533-548.
- 301 **Rocher A, Obeso A, Cachero MT, Herreros B, González C. 1994.** Participation of Na⁺ channels in the response of carotid body chemoreceptor cells to hypoxia. *Am J Physiol* **267**: C738-C744.
- 302 **Rocher A, Geijo-Barrientos E, Cáceres AI, Rigual R, González C, Almaraz L. 2005.** Role of voltage-dependent calcium channels in stimulus-secretion coupling in rabbit carotid body chemoreceptor cells. *J Physiol* **562**: 407-420.
- 303 **Rocher A, Cáceres AI, Almaraz L, González C. 2009.** EPAC signalling pathways are involved in low PO₂ chemoreception in carotid body chemoreceptor cells. *J Physiol* **587**: 4015-4027.
- 304 **Rocher A, Cáceres AI, Obeso A, González C. 2011.** Tetrodotoxin as a tool to elucidate sensory transduction mechanisms: the case for the arterial chemoreceptors of the carotid body. *Mar Drugs* **9**: 2683-2704.
- 305 **Rochette L, Ghibu S, Richard C, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. 2013.** Direct and indirect antioxidant properties of alpha-lipoic acid and therapeutic potential. *Mol Nutr Food Res* **57**: 114-125.
- 306 **Rong W, Gourine AV, Cockayne DA, Xiang Z, Ford AP, Spyer KM, Burnstock G. 2003.** Pivotal role of nucleotide P2X₂ receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J Neurosci* **23**: 11315-11321.
- 307 **Roze H, Lafargue M, Ouattara A. 2011.** Case scenario: Management of intraoperative hypoxemia during one-lung ventilation. *Anesthesiology* **114**: 167-174.
- 308 **Rubin LJ, Naeije R. 2004.** Sildenafil for enhanced performance at high altitude? *Ann Intern Med* **141**: 233-235.
- 309 **Sanchez D, López-López JR, Pérez-García MT, Sanz-Alfayate G, Obeso A, Ganfornina MD, González C. 2002.** Molecular identification of K_valpha subunits that contribute to the

- oxygen-sensitive K⁺ current of chemoreceptor cells of the rabbit carotid body. *J Physiol* **542**: 369-382.
- 310 **Sanders KA, Sundar KM, He L, Dinger B, Fidone S, Hoidal JR. 2002.** Role of components of the phagocytic NADPH oxidase in oxygen sensing. *J Appl Physiol* **93**: 1357-1364.
- 311 **Sanz-Alfayate G, Obeso A, Agapito MT, González C. 2001.** Reduced to oxidized glutathione ratios and oxygen sensing in calf and rabbit carotid body chemoreceptor cells. *J Physiol* **537**: 209-220.
- 312 **Saran M, Bors W. 1994.** Signalling by O₂^{•-} and NO[•]: how far can either radical, or any specific reaction product, transmit a message under in vivo conditions? *Chem Biol Interact* **90**: 35-45.
- 313 **Schafer FQ, Buettner GR. 2001.** Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* **30**: 1191-1212.
- 314 **Scherrer U, Vollenweider L, Delabays A, Savcic M, Eichenberger U, Kleger GR, Fikrle A, Ballmer PE, Nicod P, Bartsch P. 1996.** Inhaled nitric oxide for high-altitude pulmonary edema. *N Engl J Med* **334**: 624-629.
- 315 **Schultz HD, Del RR, Ding Y, Marcus NJ. 2012.** Role of neurotransmitter gases in the control of the carotid body in heart failure. *Respir Physiol Neurobiol* **184**: 197-203.
- 316 **Schumacker PT. 2011.** Lung cell hypoxia: role of mitochondrial reactive oxygen species signaling in triggering responses. *Proc Am Thorac Soc* **8**: 477-484.
- 317 **Seamon KB, Daly JW. 1986.** Forskolin: its biological and chemical properties. *Adv Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res* **20**: 1-150.
- 318 **Seidler FJ, Slotkin TA. 1985.** Adrenomedullary function in the neonatal rat: responses to acute hypoxia. *J Physiol* **358**: 1-16.
- 319 **Seino S, Shibasaki T. 2005.** PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol Rev* **85**: 1303-1342.
- 320 **Sekiguchi F, Seo M, Sunano S. 2003.** Contraction of arterial smooth muscle of normotensive and spontaneously hypertensive rats by manganese(III)tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)porphyrin (MnTMPyP). *J Pharmacol Sci* **92**: 163-165.
- 321 **Semenza GL. 2000.** HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol (1985)* **88**: 1474-1480.
- 322 **Sen CK. 1998.** Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem Pharmacol* **55**: 1747-1758.
- 323 **Shimoda LA, Udem C. 2010.** Interactions between calcium and reactive oxygen species in pulmonary arterial smooth muscle responses to hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* **174**: 221-229.
- 324 **Sinnarajah S, Dessauer CW, Srikumar D, Chen J, Yuen J, Yilma S, Dennis JC, Morrison EE, Vodyanoy V, Kehrl JH. 2001.** RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III. *Nature* **409**: 1051-1055.
- 325 **Snyder SH. 1992.** Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* **257**: 494-496.
- 326 **Soderling SH, Beavo JA. 2000.** Regulation of cAMP and cGMP signaling: new phosphodiesterases and new functions. *Curr Opin Cell Biol* **12**: 174-179.
- 327 **Somekawa S, Fukuhara S, Nakaoka Y, Fujita H, Saito Y, Mochizuki N. 2005.** Enhanced functional gap junction neofunction by protein kinase A-dependent and Epac-dependent signals downstream of cAMP in cardiac myocytes. *Circ Res* **97**: 655-662.
- 328 **Sorbini CA, Grassi V, Solinas E, Muesan G. 1968.** Arterial oxygen tension in relation to age in healthy subjects. *Respiration* **25**: 3-13.
- 329 **Stea A, Jackson A, Nurse CA. 1992.** Hypoxia and N⁶,O^{2'}-dibutyryl adenosine 3',5'-cyclic monophosphate, but not nerve growth factor, induce Na⁺ channels and hypertrophy in chromaffin-like arterial chemoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 9469-9473.

- 330 **Stea A, Jackson A, Macintyre L, Nurse CA. 1995.** Long-term modulation of inward currents in O₂ chemoreceptors by chronic hypoxia and cyclic AMP in vitro. *J Neurosci* **15**: 2192-2202.
- 331 **Streit BR, Blanc B, Lukat-Rodgers GS, Rodgers KR, Dubois JL. 2010.** How active-site protonation state influences the reactivity and ligation of the heme in chlorite dismutase. *J Am Chem Soc* **132**: 5711-5724.
- 332 **Stvolinsky SL, Kukley ML, Dobrota D, Matejovicova M, Tkac I, Boldyrev AA. 1999.** Carnosine: an endogenous neuroprotector in the ischemic brain. *Cell Mol Neurobiol* **19**: 45-56.
- 333 **Sudhof TC. 2004.** The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**: 509-547.
- 334 **Suh JH, Shigeno ET, Morrow JD, Cox B, Rocha AE, Frei B, Hagen TM. 2001.** Oxidative stress in the aging rat heart is reversed by dietary supplementation with (R)-(α)-lipoic acid. *FASEB J* **15**: 700-706.
- 335 **Suh JH, Moreau R, Heath SH, Hagen TM. 2005.** Dietary supplementation with (R)- α -lipoic acid reverses the age-related accumulation of iron and depletion of antioxidants in the rat cerebral cortex. *Redox Rep* **10**: 52-60.
- 336 **Sunahara RK, Taussig R. 2002.** Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling. *Mol Interv* **2**: 168-184.
- 337 **Sutherland EW, RALL TW. 1958.** Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* **232**: 1077-1091.
- 338 **Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP. 2012.** Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev* **92**: 367-520.
- 339 **Tamayo L, López-López JR, Castaneda J, González C. 1997.** Carbon monoxide inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats by a cGMP-independent mechanism. *Pflugers Arch* **434**: 698-704.
- 340 **Tan ZY, Lu Y, Whiteis CA, Benson CJ, Chapleau MW, Abboud FM. 2007.** Acid-sensing ion channels contribute to transduction of extracellular acidosis in rat carotid body glomus cells. *Circ Res* **101**: 1009-1019.
- 341 **Tang WJ, Krupinski J, Gilman AG. 1991.** Expression and characterization of calmodulin-activated (type I) adenylyl cyclase. *J Biol Chem* **266**: 8595-8603.
- 342 **Taussig R, Gilman AG. 1995.** Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J Biol Chem* **270**: 1-4.
- 343 **Taylor CT, Moncada S. 2010.** Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30**: 643-647.
- 344 **Taylor SC, Roberts ML, Peers C. 1999.** Acid-evoked quantal catecholamine secretion from rat phaeochromocytoma cells and its interaction with hypoxia-evoked secretion. *J Physiol* **519 Pt 3**: 765-774.
- 345 **Thompson CM, Wyatt CN. 2011.** Inhibition of adenylyl cyclase attenuates muscarinic Ca(2)(+) signaling by a PKA-independent mechanism in rat carotid body Type I cells. *Respir Physiol Neurobiol* **175**: 90-96.
- 346 **Tian G, Sandler S, Gylfe E, Tengholm A. 2011.** Glucose- and hormone-induced cAMP oscillations in α - and β -cells within intact pancreatic islets. *Diabetes* **60**: 1535-1543.
- 347 **Tracy M, Downe L, Holberton J. 2004.** How safe is intermittent positive pressure ventilation in preterm babies ventilated from delivery to newborn intensive care unit? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **89**: F84-F87.
- 348 **Travis DM. 1971.** Molecular CO₂ is inert on carotid chemoreceptor: demonstration by inhibition of carbonic anhydrase. *J Pharmacol Exp Ther* **178**: 529-540.
- 349 **Trivedi RK, Kallem RR, Mamidi RN, Mullangi R, Srinivas NR. 2004.** Determination of lipoic acid in rat plasma by LC-MS/MS with electrospray ionization: assay development, validation and application to a pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr* **18**: 681-686.

- 350 **Tsalkova T, Mei FC, Li S, Chepurny OG, Leech CA, Liu T, Holz GG, Woods VL, Jr., Cheng X. 2012.** Isoform-specific antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 18613-18618.
- 351 **Turner PJ, Buckler KJ. 2013.** Oxygen and mitochondrial inhibitors modulate both monomeric and heteromeric TASK-1 and TASK-3 channels in mouse carotid body type-1 cells. *J Physiol* **591**: 5977-5998.
- 352 **Turrens JF. 2003.** Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* **552**: 335-344.
- 353 **Vicario I, Rigual R, Obeso A, González C. 2000.** Characterization of the synthesis and release of catecholamine in the rat carotid body in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**: C490-C499.
- 354 **Vicario I, Obeso A, Rocher A, López-López JR, González C. 2000.** Intracellular Ca²⁺ stores in chemoreceptor cells of the rabbit carotid body: significance for chemoreception. *Am J Physiol Cell Physiol* **279**: C51-C61.
- 355 **Vitvitsky V, Kabil O, Banerjee R. 2012.** High turnover rates for hydrogen sulfide allow for rapid regulation of its tissue concentrations. *Antioxid Redox Signal* **17**: 22-31.
- 356 **Von Euler U, Liljestrand G. 1946.** Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiol Scand* **12**: 301-320.
- 357 **Wang J, Shimoda LA, Weigand L, Wang W, Sun D, Sylvester JT. 2005.** Acute hypoxia increases intracellular [Ca²⁺] in pulmonary arterial smooth muscle by enhancing capacitative Ca²⁺ entry. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**: L1059-L1069.
- 358 **Wang WJ, Cheng GF, Yoshizaki K, Dinger B, Fidone S. 1991.** The role of cyclic AMP in chemoreception in the rabbit carotid body. *Brain Res* **540**: 96-104.
- 359 **Wang ZZ, Stensaas LJ, Dinger BG, Fidone SJ. 1995.** Nitric oxide mediates chemoreceptor inhibition in the cat carotid body. *Neuroscience* **65** : 217-229.
- 360 **Ward MP, Milledge JS, West JB. 1995.** *High altitude Medicine and Physiology*, second edition edn., London, UK.
- 361 **Ward JP, Aaronson PI. 1999.** Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction: can anyone be right? *Respir Physiol* **115**: 261-271.
- 362 **Ward JP. 2008.** Oxygen sensors in context. *Biochim Biophys Acta* **1777**: 1-14.
- 363 **Wasserman K, Whipp BJ, Koyal SN, Cleary MG. 1975.** Effect of carotid body resection on ventilatory and acid-base control during exercise. *J Appl Physiol* **39**: 354-358.
- 364 **Waypa GB, Marks JD, Guzy R, Mungai PT, Schriewer J, Dokic D, Schumacker PT. 2010.** Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* **106**: 526-535.
- 365 **Weil JV, Byrne-Quinn E, Sodal IE, Friesen WO, Underhill B, Filley GF, Grover RF. 1970.** Hypoxic ventilatory drive in normal man. *J Clin Invest* **49**: 1061-1072.
- 366 **Weir EK, Archer SL. 2010.** The role of redox changes in oxygen sensing. *Respir Physiol Neurobiol* **174**: 182-191.
- 367 **Wenninger JM, Olson EB, Wang Z, Keith IM, Mitchell GS, Bisgard GE. 2006.** Carotid sinus nerve responses and ventilatory acclimatization to hypoxia in adult rats following 2 weeks of postnatal hyperoxia. *Respir Physiol Neurobiol* **150**: 155-164.
- 368 **Whipp BJ. 1983.** Ventilatory control during exercise in humans. *Annu Rev Physiol* **45**: 393-413.
- 369 **Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C, Kemp PJ. 2004.** Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* **306**: 2093-2097.
- 370 **Willoughby D, Cooper DM. 2006.** Use of single-cell imaging techniques to assess the regulation of cAMP dynamics. *Biochem Soc Trans* **34**: 468-471.

- 371 **Wilson HL, Dipp M, Thomas JM, Lad C, Galione A, Evans AM. 2001.** Adp-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase act as a redox sensor. a primary role for cyclic ADP-ribose in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Biol Chem* **276**: 11180-11188.
- 372 **Wood H. 1902.** A physiological study of the pulmonary circulation. *Am J Physiol* **30**: 283-295.
- 373 **Wyatt CN, Mustard KJ, Pearson SA, Dallas ML, Atkinson L, Kumar P, Peers C, Hardie DG, Evans AM. 2007.** AMP-activated protein kinase mediates carotid body excitation by hypoxia. *J Biol Chem* **282**: 8092-8098.
- 374 **Yu JH, Kim KH, Kim DG, Kim H. 2007.** Diphenyleiodonium suppresses apoptosis in cerulein-stimulated pancreatic acinar cells. *Int J Biochem Cell Biol* **39**: 2063-2075.
- 375 **Yuan LL, Chen X, Kunjilwar K, Pfaffinger P, Johnston D. 2006.** Acceleration of K⁺ channel inactivation by MEK inhibitor U0126. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**: C165-C171.
- 376 **Yuan LL, Chen X. 2006.** Diversity of potassium channels in neuronal dendrites. *Prog Neurobiol* **78**: 374-389.
- 377 **Yuan XJ, Goldman WF, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. 1993.** Hypoxia reduces potassium currents in cultured rat pulmonary but not mesenteric arterial myocytes. *Am J Physiol* **264**: L116-L123.
- 378 **Zapata P. 1997.** Chemosensory activity in the carotid nerve: effects of pharmacological agents. In: *The mammalian carotid body*. González C ed. Heidelberg, Alemania: Springer-Verlag, 119-146.
- 379 **Zhang M, Zhong H, Vollmer C, Nurse CA. 2000.** Co-release of ATP and ACh mediates hypoxic signalling at rat carotid body chemoreceptors. *J Physiol* **525 Pt 1**: 143-158.
- 380 **Zhang M, Nurse CA. 2004.** CO₂/pH chemosensory signaling in co-cultures of rat carotid body receptors and petrosal neurons: role of ATP and ACh. *J Neurophysiol* **92**: 3433-3445.
- 381 **Zhang M, Buttigieg J, Nurse CA. 2007.** Neurotransmitter mechanisms mediating low-glucose signalling in cocultures and fresh tissue slices of rat carotid body. *J Physiol* **578**: 735-750.
- 382 **Zippin JH, Farrell J, Huron D, Kamenetsky M, Hess KC, Fischman DA, Levin LR, Buck J. 2004.** Bicarbonate-responsive "soluble" adenylyl cyclase defines a nuclear cAMP microdomain. *J Cell Biol* **164**: 527-534.