



---

# **Universidad de Valladolid**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO de Biología Celular, Histología y Farmacología

TESIS DOCTORAL

TÍTULO:

**Estudio comparativo del control respiratorio y de la defensa frente a la hipoxia mediados por el cuerpo carotídeo en cobaya y rata.**

Presentada por **Elvira González Obeso** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Gómez Niño  
Dra. Asunción Rocher Martín

2014









**Estudio comparativo del control respiratorio y de la  
defensa frente a la hipoxia mediados por el cuerpo  
carotídeo en cobaya y rata.**

**Autora: Elvira González Obeso**

**Directoras:**

**Dra. M<sup>a</sup> Ángeles Gómez Niño  
Dra. Asunción Rocher Martín**

**Universidad de Valladolid, 2014**





---

**Universidad de Valladolid**

**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

*(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)*

**D. M<sup>a</sup> Angeles Gómez Niño**, con D.N.I. nº 12359753J, Profesora del Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología y **D. Asunción Rocher Martín** con DNI 12362120B, Profesora del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología, Facultad de Medicina, como Directoras de la Tesis Doctoral titulada "*ESTUDIO COMPARATIVO DEL CONTROL RESPIRATORIO Y DE LA DEFENSA FRENTE A LA HIPOXIA MEDIADOS POR EL CUERPO CAROTÍDEO EN COBAYA Y RATA*", presentada por D. Elvira González Obeso, con DNI 71129097X, alumna del programa de doctorado impartido por el departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología,

AUTORIZAN la presentación de la misma, considerando que la doctoranda Elvira González Obeso ha superado el nivel de formación necesaria para aspirar al Título de Doctor mediante la realización de un proyecto de investigación original cuyo contenido responde al título de la Tesis y aporta un estudio de relevancia en relación a la función de los quimiorreceptores arteriales y la detección de oxígeno por el cuerpo carotídeo.

El trabajo de Tesis se ha desarrollado con la metodología adecuada, se ha redactado de forma correcta y con la documentación bibliográfica pertinente y los hallazgos se discuten de forma ordenada y lógica. Las conclusiones están sustentadas por los datos obtenidos y por la bibliografía actual.

Valladolid, 30 de Septiembre de 2014

Las Directoras de la Tesis,

Fdo.: M<sup>a</sup> Angeles Gómez Niño

Asunción Rocher Martín





***A Luis Colomé Parra***  
***A Valentina Colomé González***  
***A Ana y Constancio González Obeso***



## **AGRADECIMIENTOS**



Al escribir los agradecimientos me ha asaltado el miedo de cometer alguna falta. No cabe duda que el olvido representa un acto de desagradecimiento tácito, de ingratitud, de hacer sentirse incómodo a alguien próximo a ti mismo: y se olvidó de mí, diría el olvidado. Siendo el olvido la falta mayor en unos agradecimientos, también se pueden cometer agravios comparativos usando palabras o expresiones demasiado laudatorias para unos y parcas en elogios para otros. Espero no olvidarme de nadie y ser prudente en mis palabras.

Mi gratitud a las doctoras Ángela Gómez-Niño y Asunción Rocher Martín, directoras de este trabajo que presento como mi Tesis Doctoral. Durante todos los años que las conozco, y son muchos, siempre me han ayudado con una sonrisa y con mucha paciencia.

Al doctor Javier Castañeda Casado que tan amenas hacía las largas horas de experimentos con sus remembranzas de los primeros pasos de nuestra actual Facultad de Medicina.

A los doctores Francisco Pérez Vizcaíno y Angel Cogolludo Torralba en cuyo laboratorio se realizaron los experimentos de patch-clamp.

A Elena Olea Fraile por su ayuda insustituible en la ejecución y análisis de multitud de experimentos y a Teresa Gallego Martín, que en la oscuridad y en silencio ha obtenido los datos de medida de calcio intracelular.

A María de los Llanos Bravo Otero, Elena González Muñoz y Ana Gordillo Cano que han contribuido día a día a la realización de los experimentos y han resuelto los problemas cromatográficos y de cuidado de animales que este trabajo ha presentado.

A Josefina Revuelta Crespo que desde la Secretaría del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología ha sido una tabla de salvación cuando se acababan plazos o había que llenar algún impreso.

A Anabel Cáceres Bustos, que durante la realización del trabajo del DEA, estuvo a mi lado clonando subunidades de canales de calcio. También de los años del DEA guardo buena memoria de Mamen, M<sup>a</sup> del Carmen González Martín, de Toya, M<sup>a</sup> Victoria Vega-Agapito, de Gloria Sanz Alafayate, de Jesús Prieto Lloret, De Alberto Rico Martín y, como no, de Silvia Vilares Conde, gracias a todos ellos.

No quiero dejar pasar esta ocasión sin referirme con cariño a todos los miembros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Fisiología. Los Dres. Ricardo

Rigual Bonastre, Laura Almaraz Gómez, Javier Álvarez Martín, Mayte Montero Zoccola y por supuesto José Ramón López López y M<sup>a</sup> Teresa Pérez García, fueron los más cercanos a mí, y, además de mis profesores, fueron algo más...

Quiero también agradecer al Departamento de Biología Celular, Histología y Farmacología que aceptó el traslado de mi expediente y mi proyecto de Tesis Doctoral.

Finalmente, *last but not least*, quiero agradecer a los Dres. Constancio González Martínez y Ana Obeso Cáceres que, además de sus apellidos, me han dado su ejemplo y cariño.

Elvira González Obeso

## **ABREVIATURAS**





A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, isoformas de receptores purinérgicos P1 que ligan adenosina y están acoplados a proteínas G

Ach, acetilcolina

ACTH, hormona adrenocorticotropa

AMPc, adenosin monofosfato cíclico (adenosín monofosfato-3',5' cíclico)

AMPK, quinasa dependiente de AMP

AO<sub>2</sub>-VO<sub>2</sub>, diferencia arteriovenosa de O<sub>2</sub>

BSA, albúmina de suero bovino

BTPS, condiciones corporales de temperatura, presión barométrica, temperatura y saturación de vapor de agua

CA, catecolaminas

CaO<sub>2</sub>, contenido de O<sub>2</sub> en sangre arterial

CBS, cistationina beta sintasa

CC, cuerpo carotídeo

CQ, células quimiorreceptoras

CSE, cistationina gamma liasa

CvO<sub>2</sub>, contenido de O<sub>2</sub> en sangre venosa

DA, dopamina

DAPI, 4',6-diamino-2-fenilindol, marcador fluorescente de ADN que emite en la banda del azul

DMEM, Dulbecco's modified eagle's medium, medio de cultivo muy común

DNP, dinitrofenol, un protonóforo clásico

DOPAC, ácido dihidroxi-fenil acetico, catabolito de la dopamina

DPI, difenileneiodonio

E, epinefrina

EDTA, ácido etilendiaminotetraacético

Em, potencial de membrana

EPO, eritropoyetina

FITC, fluoresceína isothiocyanato, colorante fluorescente que emite en la región del color verde

fR, frecuencia respiratoria

GCS, ganglio cervical superior

GMPC, guanosín monofosfato cíclico (guanosín monofosfato 3',5'-cíclico)

GSH, glutation reducido

GSSG, glutation oxidado

Hb, hemoglobina

HEK, celulas HEK, línea celular estable derivada riñon embrionario humano

HIF-1 $\alpha$ , factor inducible por la hipoxia 1 alfa

HPLC, cromatografía líquida de alta presión

I/V, relación entre corriente y voltaje (potencial de membrana)

I<sub>A</sub>, corriente de K<sup>+</sup> de activación e inactivación rápida

K<sub>ATP</sub>, canales de K<sup>+</sup> sensibles o regulados por ATP

Kv1 (*shaker*), canal de K<sup>+</sup> que expresa una corriente de tipo I<sub>A</sub> que en un variante mutada produce movimientos anómalos en la mosca de la fruta

Kv4 (*shal*), canal de K<sup>+</sup> que expresa una corriente de tipo I<sub>A</sub> con cinética comparable a la *shaker*

MA, médula adrenal

Maxi-K o MaxiK, canal de K<sup>+</sup> dependiente de Ca<sup>2+</sup> de alta conductancia

NADPH oxidase, oxidasa dependiente de NADPH

NADPH, nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NE, norepinefrina

NO, óxido nítrico

NOS, óxido nítrico sintasa

NSC, nervio del seno carotídeo

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, anión superóxido

P2X2, P2X3, isoformas de receptores purinérgicos P2 que ligan ATP y que conforman un canal catiónico comparable al nicotínico de la placa motora

PA, presión arterial sistémica

pA/pF, densidad de corriente a través de una membrana (pico-amperios/pico-faradios)

P<sub>A</sub>CO<sub>2</sub>, presión alveolar de CO<sub>2</sub>

P<sub>a</sub>CO<sub>2</sub>, presión arterial de CO<sub>2</sub>

P<sub>A</sub>O<sub>2</sub>, presión alveolar de O<sub>2</sub>

PaO<sub>2</sub>, presión arterial de O<sub>2</sub>

PAP, presión arterial pulmonar  
*PB*, buffer de fosfato  
PB, presión barométrica  
PBS, solución salina tamponada con un buffer de fosfatos  
PCA, ácido perclórico  
PCO, presión de monóxido de carbono  
 $P_{iO_2}$ , presión de  $O_2$  en aire inspirado saturado de vapor de agua (en tráquea)  
 $P_{vO_2}$ , presión de  $O_2$  en sangre venosa  
RNAm, ácido ribonucleico mensajero  
ROS, especies reactivas de oxígeno  
SEM, error estándar de la media  
SIF o células SIF, células pequeñas intensamente fluorescentes  
STEX, variante del maxiK con un exon sensible al stress oxidativo  
TASK-1, TASK-3, (tandem or two pore acide sensitive K<sup>+</sup> channels)  
TE, tiempo espiratorio (duración de la espiración)  
TEA, tetraetil amonio  
TH, tirosina hidroxilasa (tirosina-3-monoxigenasa)  
TI, tiempo inspiratorio (duración de la inspiración)  
TTX, tetrodotoxina  
VC, volumen corriente  
VC/TE, flujo espiratorio  
VC/TI, flujo inspiratorio  
VDCC, canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje  
VEGF, factor de crecimiento vascular dependiente de endotelio  
VM, ventilación total o volumen minuto  
VPH, vasoconstricción pulmonar hipóxica



## ÍNDICE



<i>Contraportada</i>	III
<i>Certificado</i>	V
<i>Dedicatoria</i>	VII
<i>Agradecimientos</i>	IX
<i>Abreviaturas</i>	XIII
<i>Índice</i>	XIX
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. Algunos datos históricos.	3
2. Localización, estructura e inervación del CC.	6
3. La hipoxia y la defensa frente a la hipoxia.	11
3.1. Concepto y clasificación de la hipoxia.	11
3.2. La hipoxia hipóxica hipobárica. Concepto de hipoxia fisiológica.	12
3.3. Respuestas a la hipoxia fisiológica y su significado adaptativo.	13
3.3.1. Introducción.	13
3.3.2. Vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH).	16
3.3.3. Hiperventilación en respuesta a la hipoxia hipóxica.	20
3.3.4. La policitemia.	23
3.3.5. Otras respuestas a la hipoxia hipóxica.	25
3.3.5.1. Respuestas endocrinas.	25
3.3.5.2. Resistencias de las vías aéreas e hipoxia.	26
3.3.6. Respuestas a la hipoxia en el neonato.	27
3.4. Mecanismos moleculares de detección de los estímulos en el CC.	30
3.4.1. Detección de estímulos por las células quimiorreceptoras.	30
3.4.1.1. Mecanismo de detección de la PO <sub>2</sub> .	33
A. <i>Candidatos a sensores de O<sub>2</sub> en las células quimiorreceptoras.</i>	34
B. <i>Mecanismos de acoplamiento entre el sensor y los canales de</i>	37

<i>K<sup>+</sup></i> .	
C. <i>Canales de K<sup>+</sup> sensibles a la hipoxia y su presumible función.</i>	38
3.4.1.2. Mecanismo de detección de estímulos ácidos-hipercápnicos.	40
3.4.2. Comunicación entre las CQ y las terminaciones nerviosas.	
Neurotransmisión en el CC.	40
3.5. El caso especial del cobaya.	44
OBJETIVOS Y JUSTIFICACION	51
MATERIAL Y MÉTODOS	55
1. Animales.	57
2. Pletismografía.	57
3. Exposición a hipoxia crónica.	59
4. Anestesia y cirugía. Registro de presión arterial.	60
5. Experimentos de síntesis y liberación de CA en CC y médula adrenal.	62
6. Medida de catecolaminas endógenas y marcadas isotópicamente.	64
7. Estudios morfológicos: Perfusión de los animales, disociación del CC, cultivo de células quimiorreceptoras e inmunocitoquímica. Medida de calcio intracelular.	65
7.1. Perfusión de los animales.	66
7.2. Disociación de los CC y cultivo de células quimiorreceptoras.	67
7.3. Inmunocitoquímica.	67
7.4. Medida de Ca <sup>2+</sup> intracelular.	68
7.5. Registro de las corrientes de K <sup>+</sup> : estudios electrofisiológicos.	69
RESULTADOS	71
1. Identificar posibles diferencias en la morfología y morfometría básicas del CC de cobaya y de rata.	73
2. Verificar si el cobaya hiperventila o no en respuesta a los estímulos hipóxico e hipercápnico estudiando el proceso de aclimatización a la hipoxia crónica.	76
3. Caracterizar el metabolismo de las CA en el CC de cobaya, en particular la	79



liberación en respuesta a la hipoxia y a otros estímulos clásicos del CC.	
3.1. Contenido, síntesis y turnover de CA,	79
3.2. Liberación de <sup>3</sup> H-CA inducida por diversos estímulos en el CC de cobaya y rata.	83
4. Cuantificar las modificaciones de los niveles de Ca <sup>2+</sup> intracelular inducidas por la hipoxia en las CQ de cobaya aisladas.	87
5. Verificar la existencia de corrientes de K <sup>+</sup> sensibles a la hipoxia en las CQ del cobaya.	89
6. Analizar los efectos de la hipoxia sobre la presión arterial, glucemia, lactacidemia y niveles de CA plasmáticas y la posible sensibilidad directa de las células cromafines de la médula adrenal a la hipoxia.	91
DISCUSIÓN	97
1. Aspectos morfológicos e inmunocitoquímicos.	99
2. Cuerpo carotídeo y reflejos respiratorios.	101
3. Cuerpo carotídeo y función de las células quimiorreceptoras medida como respuesta secretora de catecolaminas.	104
4. Cuerpo carotídeo y función de las células quimiorreceptoras medida como transitorios de calcio intracelular.	109
5. Verificar la existencia de corrientes de K <sup>+</sup> sensibles a la hipoxia en las CQ del cobaya.	110
6. Analizar los efectos de la hipoxia sobre la presión arterial, glucemia, lactacidemia y niveles de catecolaminas plasmáticas y la posible sensibilidad directa de las células cromafines de la médula adrenal a la hipoxia.	112
CONCLUSIONES	121
REFERENCIAS	125



# **INTRODUCCIÓN**



## 1. Algunos datos históricos.

La historia del cuerpo carotídeo (CC) se inicia, tal y como hoy la conocemos, el 31 de enero de 1743, día en que Hardovicus Wilhelmus Ludovicus Taube defendió su tesis Doctoral. Taube era discípulo de Victor Albrecht von Haller, autor de la obra *Elementa Physiologiae Corporis Humani*, considerada uno de los preámbulos de la Fisiología moderna y en la que la fisiología se define como anatomía en movimiento. La tesis doctoral de Taube estaba dedicada al estudio del origen de los nervios intercostales y, en ella, Taube describe el “*ganglion minutum*” situado en el ángulo que forman las carótidas interna y externa, aunque fue incapaz de trazar el trayecto de las ramas de dicho ganglio. El *ganglion minutum* es el cuerpo carotídeo. Según recoge Adams en su libro (1958), las referencias al CC aparecen en la literatura hasta bien entrado el siglo XX con diferentes nombres. El propio Haller se refiere al CC con el nombre de *ganglion exiguum* y Neubauer, el descubridor de la arteria tiroidea media lo llamó *ganglion parvum*. Andersch, el descubridor del ganglio del glossofaríngeo o ganglio de Andersch, lo llamó *ganglion intercaroticum* al igual que lo hizo Mayer, un prolífico profesor de anatomía de Berna autor de muchos tratados de la época (hacia 1850).

Como se puede deducir, los nombres iniciales del CC hacían referencia a tres hechos: que se trataba de un ganglio, que era muy pequeño y que se situaba entre las carótidas, en la bifurcación carotídea. Luschka el gran anatómico de Tübingen y descubridor entre otras cosas de los forámenes de Luschka derecho e izquierdo que comunican el IV ventrículo con el espacio subaracnoideo, llamó al CC *glandula intercarotica* haciendo referencia específica a su estructura de tipo glandular con agrupaciones celulares bien definidas. Arnold, prestigioso anatomopatólogo, discípulo de Virchow, descubridor de la malformación de Arnold-Chiari (protrusión de las amígdalas cerebelosas y del tronco del encéfalo a través del foramen magnum hacia el canal medular) se refirió al CC con el nombre *glomerulus arteriosus intercaroticus* haciendo referencia a la riqueza vascular del órgano que tiene en efecto la apariencia de un pequeño pelotón vascular. Ya en 1900, Kohn, profesor de anatomía en Praga, se refirió al CC como *paraganglion intercaroticum* y lo describió como un pequeño órgano o grupo celular que derivado de la cresta neural no está formado por neuronas, está localizado al lado de los ganglios vegetativos de los que recibe la inervación y cuya función sería secretora. La médula adrenal es el prototipo del paraganglio. Ya bien entrado el siglo XX y en razón de que el CC no mostraba, o lo hacía muy débilmente, la reacción cromafín

(tinción marrón oscuro con dicromato potásico) se subdividieron los paraganglios en cromafines o simpáticos y no cromafines o parasimpáticos.

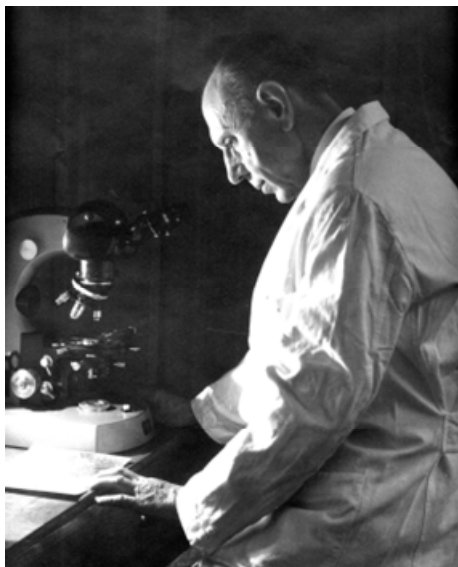
En definitiva, cuando De Castro se adentró en el campo del CC hacia 1924-25, ya que su primer trabajo es de 1926, lo último que se pensaba de este pequeño órgano era que se tratara de un órgano sensorial. En su trabajo de 1926 hace una descripción minuciosa de la estructura del órgano incluyendo la descripción de la inervación. El CC recibe inervación a través del nervio de Hering, una rama del glossofaríngeo cuyo ganglio sensorial es el ganglio de Andersch. En el trabajo de 1928, Fernando de Castro realiza el experimento clave: la sección del glossofaríngeo cefálica al ganglio sensorial de Andersch no producía degeneración de las fibras intraglómicas, lo que le llevó a concluir que la inervación del CC era sensorial y no secreto-motora. De Castro lo decía así: *“En suma, el Glomus caroticum está inervado por fibras de naturaleza centrípeta, cuyo centro trófico asienta en los ganglios sensoriales del nervio glossofaríngeo, y no por fibras centrífugas o por fibras secretoras como es el caso para las glándulas; esto es precisamente lo que hace suponer que el Glomus caroticum sea un órgano sensorial especial”* (pag. 371 de F. de Castro, 1928). En la página 375 escribía: *“Suponemos, como hipótesis verosímil, que el Glomus caroticum representa un órgano sensorial, el único hasta el presente, encargado de recibir ciertas variaciones cualitativas de la sangre, función que, tal vez por acción refleja, tendría su repercusión sobre la actividad funcional de otros órganos.”*. Y en las páginas 375-76 decía: *“Los elementos parenquimatosos del Glomus poseen teóricamente dos polos: uno vascular y otro nervioso. Por uno de los polos, estas células se encuentran en relación íntima con los capilares sinusoidales. Por el otro polo las células están inervadas. La fibra nerviosa, por tanto, no será estimulada directamente por la sangre, sino por el intermedio de las células epiteliales del órgano, las cuales, tal y como obliga a suponer su estructura, poseen una función secretora activa que intervendría en el fenómeno de la estimulación centrípeta”*.

De Castro define pues el CC como un órgano sensorial único, un quimiorreceptor que captaría modificaciones en la composición de la sangre y que originaría reflejos capaces de afectar el funcionamiento de otros órganos. Afirma además De Castro que serían las células del CC las que captarían los cambios de la composición de la sangre y que por medio de su actividad metabólica (neurotransmisión) activaría a las fibras sensoriales; esto equivale a definir al CC como un receptor sensorial secundario.

Unos pocos años más tarde, Corneille Heymans y sus colaboradores en Gante escribían un artículo que se titulaba: *Sinus carotidien et réflexes respiratoires, II. Influences respiratoires réflexes de l'acidose, de l'alcalose, de l'anhydride carbonique, de l'ion hydrogene et de l'anoxémie: Sinus carotidiens et changes respiratoires dans les poumons et au delà des poumons* (Heymans et al., 1930). El trabajo era pues la comprobación experimental de los hallazgos y

propuestas de D. Fernando de Castro: había nacido una nueva área dentro de la Fisiología sensorial y respiratoria, el campo de los quimiorreceptores arteriales. Heymans recibió el Premio Nobel en 1938.

El párrafo que sigue está tomado literalmente del Discurso de G. Liljestrand en su Presentación de Heymans como Premio Nobel en 1938: "...The glomus consists of a small mass of very fine intertwining vessels arising from the internal carotid and enclosing various different types of cells. It has been considered by some as being a sort of endocrine gland similar to the medulla of the suprarenal glands. De Castro, however, in 1928 demonstrated that the anatomy of the glomus could in no way be compared to that of the suprarenal medulla. De Castro suggested rather that the glomus was an organ whose function was to react to variations in the composition of the blood, in other words an internal gustatory organ with special «chemo-receptors». In 1930, Heymans et al., undertook to find out whether these supposed chemo-receptors were responsible for the respiratory reflexes produced by modifications in the composition of the blood. By localized destruction in the sinus area they had been able to stop reflexes initiated by pressure changes, but respiratory reflexes could still continue to occur in answer to changes in the composition of the blood. Other experiments showed that Heymans's concepts on the important role played by the glomus in the reflex control of respiration by the chemical composition of the blood were undoubtedly correct."



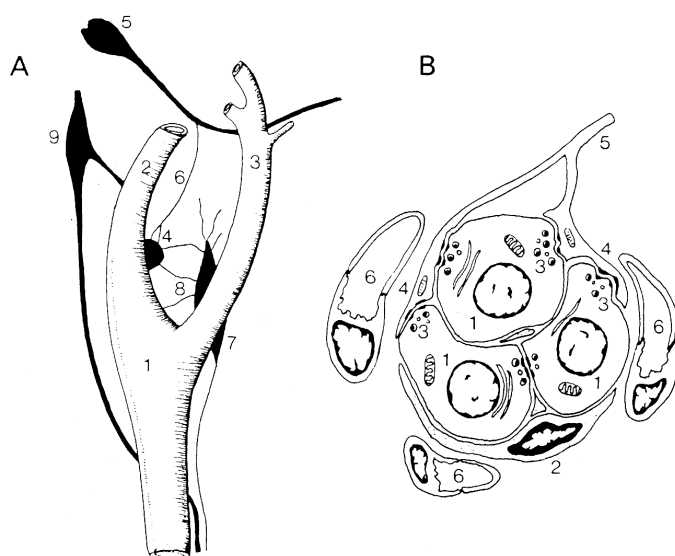
Fernando de Castro Rodríguez (1896-1967)    Corneille J. F. Heymans (1892-1968)

Este breve bosquejo histórico pretende ser un pequeño homenaje a uno de los discípulos más insignes de Cajal, D. Fernando de Castro, que como su maestro era capaz de captar la función a partir de la observación de los cortes histológicos. Tras esta introducción histórica podemos decir que el CC quedó definido a principios de los años 1930 como un órgano sensorial que detecta los cambios en la  $PO_2$ ,  $PCO_2$  y pH

sanguíneos. Se activan cuando cae la  $PO_2$  (hipoxia) o cuando aumenta la  $PCO_2$  o disminuye el pH (acidosis) y envía impulsos al SNC, al tronco del encéfalo, donde al integrarse promueven hiperventilación refleja encaminada a normalizar las presiones de gases sanguíneos. Además hay otras dianas de los impulsos resultantes de la activación de los quimiorreceptores, como el aparato circulatorio, el sistema nervioso autónomo y varias glándulas endocrinas (ver Fitzgerald y Shirahata, 1997).

## 2. Localización, estructura e inervación del CC.

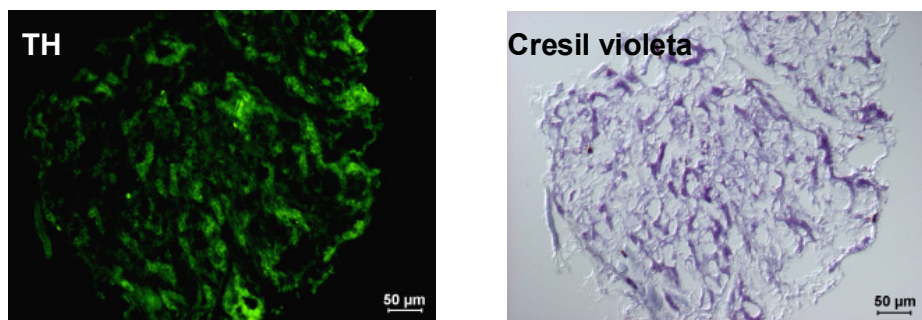
El CC de los mamíferos es un órgano par, pequeño, y localizado en la bifurcación carotídea o en una de las ramas arteriales que nacen del seno carotídeo. La localización precisa en el conejo se muestra en el esquema de la Figura 1A. El CC está organizado en islotes celulares (Figura 1B) separados entre sí por tejido conectivo y formados por dos tipos celulares, las células quimiorreceptoras (CQ) o tipo I y las células sustentaculares o tipo II. Este segundo tipo celular componente del parénquima del CC no fue identificado hasta el año 1954 por De Kock. Las primeras son más numerosas, tienen un núcleo redondo y claro y están localizadas hacia el centro de los islotes; las segundas rodean a las CQ y tienen un núcleo en forma discoidea con cromatina densa y se las ha considerado como elementos gliales o de sostén (Kondo et al., 1982), aunque recientemente a una subpoblación de células tipo II se les ha considerado como células madre, pluripotenciales capaces de generar células nerviosas dopaminérgicas (Pardal et al., 2007) con potencial capaz de ser utilizadas para implantarse en las vías nigro-estriatales para tratar la enfermedad de Parkinson (Pardal y Lopez-Barneo, 2012). En su conjunto, las células tipo II son mucho menos abundantes que las CQ o tipo I en una proporción que según distintos autores oscila entre 1 y 5.



**Figura 1.** Esquema de la bifurcación carotídea de conejo (A) y de un islote celular del cuerpo carotídeo (B). **A:** 1, carótida común; 2 y 3, carótidas interna y externa; 4, cuerpo carotídeo; 5 y 6, ganglio petroso y nervio del seno carotídeo; 7 y 8, ganglio cervical superior y nervios ganglioglomerulares; 9, ganglio nodoso. **B:** 1, CQ; 2, célula sustentacular; 3, vesículas sinápticas en las CQ; 4 y 5, terminaciones y fibra sensorial; 6, capilares sanguíneos. (González, C. et al. *Trends Neurosci.* 15:146-153, 1992).



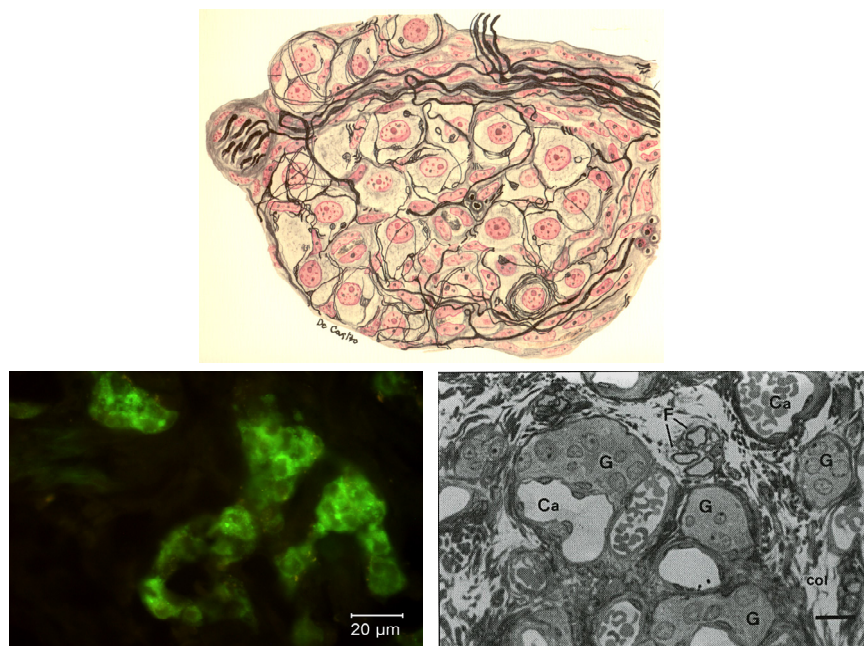
El CC es un órgano muy vascularizado con un 25-30% de la superficie de una sección histológica ocupada por la luz de los vasos (De Castro y Rubio, 1968; en el cerebro, la superficie de los vasos es  $\approx 5\%$ ). El CC es el órgano con mayor flujo del organismo (1.3 l/100g/min.) y tiene un consumo de  $O_2$  de 1.5 ml/100g/min., lo que implica que la diferencia arteriovenosa de  $O_2$  en el CC es mínima (Obeso et al., 1997). Los capilares establecen una relación estrecha con los islotes celulares, con distancias máximas de los capilares a las CQ del orden de 20  $\mu\text{m}$ , habiéndose estimado que en condiciones de normoxia no habría ningún área del CC con  $PO_2$  inferiores a 40 mmHg. El parénquima glómico medido como superficie inmunopositiva a tirosina hidroxilasa (Figura 2) representa en la rata el 25% de la superficie del CC en cortes seriados del órgano, cuando éste es fijado con una presión de perfusión de 100 mmHg. (Prieto-Lloret et al., 2004). Ha de pensarse que esta medida excluye a las células tipo II, ya que sólo las tipo I o quimiorreceptoras son positivas a tirosina hidroxilasa, el enzima limitante de la síntesis de catecolamina (CA) que se expresa de forma específica en las células tipo I, constituyendo un marcador de las mismas. El CC recibe inervación sensorial y vegetativa.



**Figure 2.** Cortes histológicos de CC de rata, obtenidos en torno a su ecuador. La parte superior corresponde a un CC de rata. A la izquierda el corte ha sido sometido a una reacción inmunocitoquímica para tirosina hidroxilasa (TH). Las células positivas aparecen en verde. A la derecha, el mismo corte ha sido contrateñido con cresil violeta para obtener una imagen de la estructura general del tejido. Obsérvese la gran densidad de capilares, que aparecen como espacios vacíos, en el tejido del CC. Las CQ son muy ricas en CA, principalmente dopamina, y por tanto la tirosina hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de estas aminas biógenas, es un marcador específico de las CQ. Aunque las terminaciones simpáticas, que penetran en el CC, también son positivas para este enzima, son muy escasas en los islotes celulares.

La inervación sensorial la recibe por el nervio del seno carotídeo (NSC), rama del glossofaríngeo ó IX par craneal. Parte de las fibras sensoriales del NSC penetran en el CC y hacen sinapsis con las CQ; desde el punto de vista funcional estas fibras son las fibras quimiorreceptoras, esto es, aquellas que son estimuladas por los

neurotransmisores liberados por las células tipo I cuando éstas se activan, y el otro contingente de fibras sensoriales del NSC alcanza el seno carotídeo, ya sea atravesando o rodeando el CC, y funcionalmente constituyen los barorreceptores carotídeos. En la rata, es muy común observar cómo el NSC se bifurca en dos y cómo uno de los dos nerviecillos resultantes penetra en el CC mientras que el otro se dirige al seno carotídeo. Fibras vegetativas simpáticas y parasimpáticas que entran en el CC inervan fundamentalmente los vasos sanguíneos.



**Figura 3.** Glomoide de gato penetrado por terminaciones nerviosas (De Castro, 1926). Sección de CC de rata teñida para TH en la que se aprecian los grupos celulares teñidos en verde y con sus núcleos negativos para el enzima (cedida por Obeso A). Sección de CC de conejo (tomada de Verna, 1997) con los grupos celulares marcados como G los capilares (Ca), unas fibras mielínicas (F) y los tabiques de colágeno (col); barra de calibración 15µm.

Desde un punto de vista puramente estructural, Fernando de Castro (1940) clasificaba los CC de las distintas especies en compactos, difusos e intermedios. En el gato por ejemplo el CC es compacto, los nidos celulares son grandes, con cientos de CQ y tabiques de conectivo entre ellos relativamente densos y no muy gruesos. Por el contrario, el conejo poseería CC difusos con nidos celulares más pequeños y mayor grosor de los tabiques conectivos. La rata tendría un CC que podría considerarse como intermedio. En la Figura 3, se muestra una imagen de un glomoide de CC de gato como lo viera De Castro, un corte de CC de conejo tomado de Verna (1997) y un corte de CC de rata teñido para tirosina hidroxilasa, donde se aprecian inequívocamente los tamaños

de los glomoides y de los tabiques de conectivo por donde discurren los abundantes capilares del CC que acercan los estímulos a las células quimiorreceptoras.

Un hecho que De Castro describió en 1926 y que fue ignorado hasta los años noventa fue la presencia de neuronas vegetativas en la superficie del CC y a lo largo del NSC, en el origen del mismo nervio a su salida del glossofaríngeo y en el propio glossofaríngeo. El hecho es que en 1969 Neil y O'Regan describieron lo que se conoce con el nombre de la vía eferente y que Fidone y Sato (1970) registraron *in vitro* en 1970 utilizando el esquema que muestra la Figura 4.

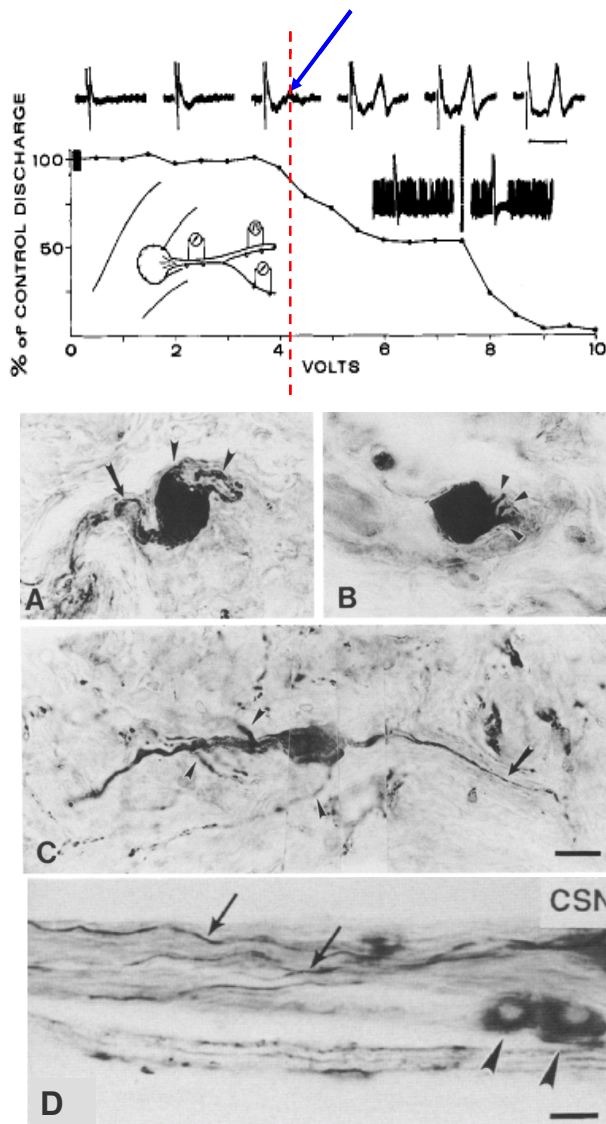
Según se describe en el pie de la Figura 4 era posible registrar la inhibición eferente (o descendente) cuando se reclutaban fibras C. Pues bien, cómo se generaba esta inhibición eferente ha sido un enigma hasta la década de 1990. En 1994 y 1995 el laboratorio del Prof. S. Fidone observó que las neuronas descritas por De Castro eran nitrérgicas y que terminaban tanto en torno a las CQ como en torno a los vasos (Wang et al., 1994, 1995).

En experimentos electrofisiológicos se demostró que el óxido nítrico era inhibitorio, proponiendo que la inhibición se produciría directamente actuando sobre las CQ e indirectamente promoviendo vasodilatación y aumentando el aporte de O<sub>2</sub> al tejido. Nurse, (Campanucci y Nurse 2005, 2007) resolvió cómo estas neuronas se activaban fisiológicamente al demostrar que las neuronas poseen corrientes de K<sup>+</sup> sensibles a la hipoxia que, al igual que en las propias CQ, se inhiben por la hipoxia, por lo se despolarizan y se activan. De esta forma se crea un circuito de inhibición cuyo significado sería prevenir la sobreestimulación del CC y la llegada de información exagerada al tronco del encéfalo.

Ultraestructuralmente, las CQ son redondeadas u ovoideas y tienen un diámetro de unas 10 μm en la mayoría de las especies. Además de las organelas celulares generales, destacando una alta densidad en mitocondrias, las CQ contienen abundantes vesículas de núcleo denso descritas por Lever y Boyd en 1957 como similares a las de las células adrenomedulares y que hoy sabemos contienen CA (dopamina, DA, y norepinefrina, NE) y ATP.

Las CQ también poseen vesículas de núcleo claro que clásicamente se ha dicho que contendrían acetilcolina (ACh). Además, las CQ poseen péptidos opioides, péptido atrial natriurético, galanina, etc. que están también almacenados en las vesículas coexistiendo con las CA, la ACh y el ATP. La presencia o no de sustancia P en las CQ

ha sido causa de intenso debate en años recientes: la ausencia de RNAm en CC de rata sería consistente con la ausencia de sustancia P en las células (Gauda et al., 1996; Gauda, 2002).



**Figura 4. (Esquema superior)** El CC sin liberar de la bifurcación y con su nervio se prepara como muestra la parte central de figura. Se separa un filete muy fino del NSC para registrar actividad mientras se estimula con un electrodo distal a intensidades crecientes y se registra en el nervio entero muy próximo al CC. En el filete nervioso se registra la actividad quimiorreceptora espontánea y en el electrodo próximo al CC se registra el potencial de acción compuesto resultante de la estimulación. Obsérvese como cuando comienzan a reclutarse las fibras C y comienza a aparecer el componente C en el potencial de acción compuesto empieza a disminuir la actividad registrada en el filete nervioso. El potencial C llega a su máximo en torno a los 8 V de estimulación pero la inhibición alcanza su máximo y si se aumenta la intensidad de estimulación cesa la actividad por bloqueo por despolarización.

Las neuronas de las imágenes **A**, **B** y **C** corresponden a tres neuronas positivas a NOS en la superficie del CC de gato. Las flechas muestran dendritas y las puntas de flecha representan ramificaciones NOS postilas (barra de calibración, 20  $\mu$ m). En **D** se muestra el nervio del seno con fibras y neuronas NOS positivas. Barra de calibración 20  $\mu$ m. (tomado de Fidone y Sato, 1970 y de Wang et al., 2004).

Las terminaciones nerviosas sensoriales que hacen sinapsis con las CQ son de forma y tamaño variable y contienen vesículas de núcleo claro y de núcleo denso (Nishi y Stensaas, 1974). Desde el punto de vista estructural las sinapsis son de dos tipos: en dirección de las células hacia las terminaciones nerviosas sensoriales, la mayoría de ellas, y el resto en la dirección opuesta. Esta bidireccionalidad estructural de las sinapsis hace posible que neurotransmisores presentes en las terminaciones sensoriales se liberen posibilitando un control por retroalimentación de la propia actividad de las CQ (ver Verna,

1997). Las fibras sensoriales que inervan a las CQ contienen DA, taquiquinina A, sustancia P, péptido relacionado con el gen de la calcitonina y neuropéptido Y, con diferentes patrones de incidencia y coexistencia en distintas fibras y especies animales. De hecho, los somas de las neuronas que inervan las CQ al contener DA, son positivas a tirosina hidroxilasa, lo que posibilita su identificación de forma sencilla en cortes del ganglio de Andersch o ganglio petroso (Katz et al., 1997).

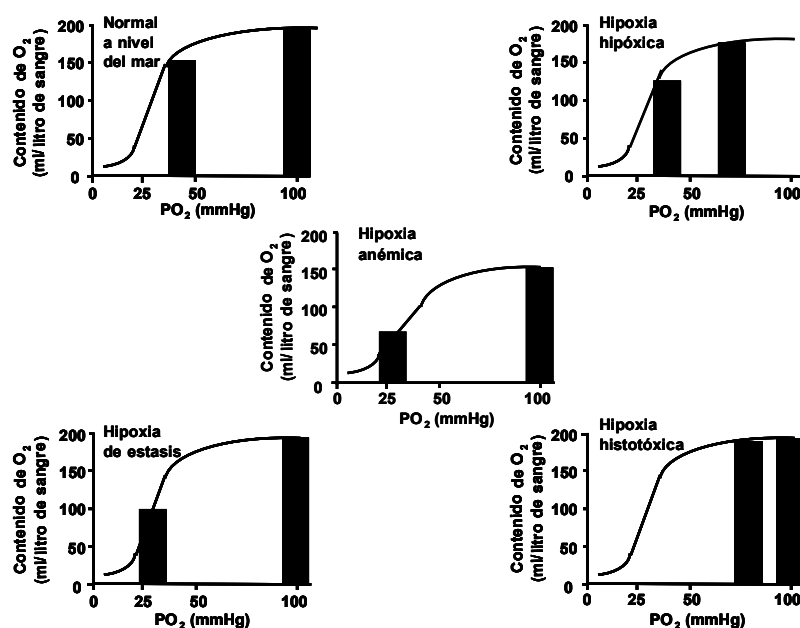
### **3. La hipoxia y la defensa frente a la hipoxia.**

#### **3.1. Concepto y clasificación de la hipoxia.**

La respiración es un proceso que ocurre en las mitocondrias por el que el  $O_2$  es reducido por los equivalentes de reducción de los nutrientes; el  $CO_2$  y el agua son los principales productos de desecho de la respiración celular. Este proceso redox (reducción del  $O_2$  y oxidación de los nutrientes), que es la respiración propiamente dicha, ocurre en múltiples etapas y en su conjunto es fuertemente exergónico. Las células poseen una maquinaria molecular acoplada a la respiración que posibilita la utilización de una parte importante de la energía liberada para sintetizar compuestos de alta energía. Estos compuestos, tipificados por el ATP, son capaces de ceder la energía contenida en sus enlaces a la propia célula para satisfacer las necesidades energéticas que exigen los procesos celulares endergónicos (en general procesos de biosíntesis) y para realizar trabajo químico, osmótico o mecánico.

Sin embargo, en un sentido más amplio, se entiende por respiración el conjunto de procesos por los que las células se aprovisionan del  $O_2$  más el conjunto de reacciones redox que culminan en la síntesis de ATP. En los animales terrestres el aporte de  $O_2$  desde la atmósfera a las células es llevado a cabo por los aparatos respiratorio y circulatorio, y consta de las siguientes etapas: bombeo del aire rico en  $O_2$  desde la atmósfera hasta los alveolos, difusión de  $O_2$  desde los alveolos a la sangre, unión del  $O_2$  a la hemoglobina, circulación de la sangre rica en  $O_2$  a todos los capilares del organismo, disociación del  $O_2$  de la hemoglobina, y difusión del  $O_2$  al medio interno, al interior de las células y de ahí a las mitocondrias, donde se oxidan los nutrientes. El  $CO_2$  sigue un recorrido inverso desde la mitocondria a la atmósfera. Desde esta concepción más amplia de la respiración es fácil definir la hipoxia e identificar los distintos tipos de hipoxia (Figura 5). Hay hipoxia siempre que la utilización de  $O_2$  por las células es insuficiente para mantener su función normal, y puede ser el resultado de 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 de la velocidad de circulación de la sangre (hipoxia de estasis) o de una incapacidad de las células para utilizar el  $O_2$  (hipoxia histotóxica). En un animal sano, fisiológicamente, sólo es posible que ocurra hipoxia hipóxica debida a la disminución de la  $PO_2$  atmosférica, como ocurre a grandes alturas al disminuir presión barométrica (PB). La hipoxia hipóxica que se produce en las enfermedades pulmonares, al igual que el resto de las hipoxias, es patológica (González, 1998).



**Figura 5.** La clasificación de las hipoxias exige conocer la  $PO_2$  en sangre arterial, el contenido de  $O_2$  en sangre arterial ( $CaO_2$ ), la  $PO_2$  en sangre venosa y el contenido de  $O_2$  en sangre venosa. En todas las gráficas la columna de la derecha corresponde a la  $PaO_2$  y  $CaO_2$  y la de la izquierda a los mismos parámetros en sangre venosa mezclada. Nótese que en el ejercicio muy intenso puede aumentar la diferencia arteriovenosa de  $O_2$  del mismo modo que ocurre en la hipoxia de estasis; a pesar que en valor absoluto el gasto cardiaco aumente marcadamente la perfusión de los grupos musculares activos no es suficiente para satisfacer las demandas de  $O_2$  y para mantener la diferencia arteriovenosa de  $O_2$  ( $AO_2-VO_2$ ) normal. Además la hipoperfusión compensatoria de los tejidos no activos (territorio esplácnico fundamentalmente) contribuye al aumento de la  $AO_2-VO_2$ . (Modificado de Obeso et al., 2006).

### 3.2. La hipoxia hipóxica hipobárica. Concepto de hipoxia fisiológica.

La hipoxia fisiológica es una hipoxia hipóxica producida por factores ambientales, esto es, por una disminución de la  $PO_2$  tal y como ocurre de forma natural a grandes alturas. La hipoxia de grandes alturas es fisiológica porque cursa sin ninguna patología durante la vida entera de los individuos y de generación en generación. No existe un límite preciso a la intensidad de la hipoxia fisiológica, sin embargo, el nivel de hipoxia que

corresponde a 4.000 m sobre el nivel del mar parece razonable. A 4.000 m le corresponde una presión barométrica de 460 mmHg, una  $PO_2$  en el aire inspirado de 87 mmHg y, si no tuviera lugar ninguna compensación ventilatoria, una  $PO_2$  alveolar de en torno a 47 mmHg. A esta presión barométrica viven casi 15 millones de personas y cuando se hacen las correcciones adecuadas por los factores raciales y nutricionales, no hay diferencias con los habitantes a nivel del mar respecto a su reproducción, crecimiento o capacidad de realizar actividad física y mental (González, 1998).

### **3.3. Respuestas a la hipoxia fisiológica y su significado adaptativo.**

#### **3.3.1. Introducción.**

La historia del estudio de la hipoxia de grandes alturas está jalonada de aventuras y anécdotas de gran interés humano y médico-fisiológico. Según señala Cannon (1995) en el estudio de la fisiología de grandes alturas confluyen, como en ningún otro, el espíritu aventurero, propio de los descubridores geográficos de los siglos XVI y XVII y el espíritu inquisitivo del investigador médico. A estos intereses habría que añadir el espíritu cristianizador de los jesuitas que permitió conocer la enfermedad de alta montaña en la literatura occidental. El Padre Jesuita José de Acosta, natural de Medina del Campo, nos narra en su "Historia Natural y Moral de las Indias" (1590) los síntomas de la enfermedad de grandes alturas tras cruzar los Andes peruanos a unos 4.800 m de altura en estos términos: *"... Cuando llegué al pico de la montaña, fui sorprendido por un dolor tan mortal y extraño, que estuve a punto de caerme, y aunque éramos muchos en compañía, cada uno se marchaba a toda prisa sin esperar por su compañero para escaparse rápidamente de aquel paraje enfermo. Fui sorprendido por dolores de agotamiento y por náuseas que yo pensé que vomitaría el corazón. Habiendo vomitado la comida y flemas, primero amarillas y luego verdes, a lo último vomité sangre ... y si esto hubiera continuado, por seguro que hubiera muerto"* (Libro 3, capítulo 9, Pag. 70; Del Pino-Díaz, 2008). La severidad de la enfermedad aguda de alta montaña no es siempre tan intensa y depende de la rapidez de la ascensión y de la altura alcanzada. La causa de la enfermedad aguda de alta montaña no se conocía: se pensaba que era causada porque la tierra emanaba vapores tóxicos, por el tremendo frío y por la reducción del calor corporal, o por la sutileza o finura del aire que hacía imposible respirar. Otros jesuitas hicieron descripciones similares en el Himalaya. Sin embargo, hasta el último cuarto del siglo XIX no se pudieron dissociar los efectos de la disminución de la presión barométrica de los del frío. Paul Bert utilizando cámaras de descompresión, consiguió reproducir la enfermedad de alta montaña a temperaturas propias de laboratorio y comprobó que la sintomatología desaparecía si los sujetos respiraban  $O_2$  aún cuando se mantuviera la presión barométrica

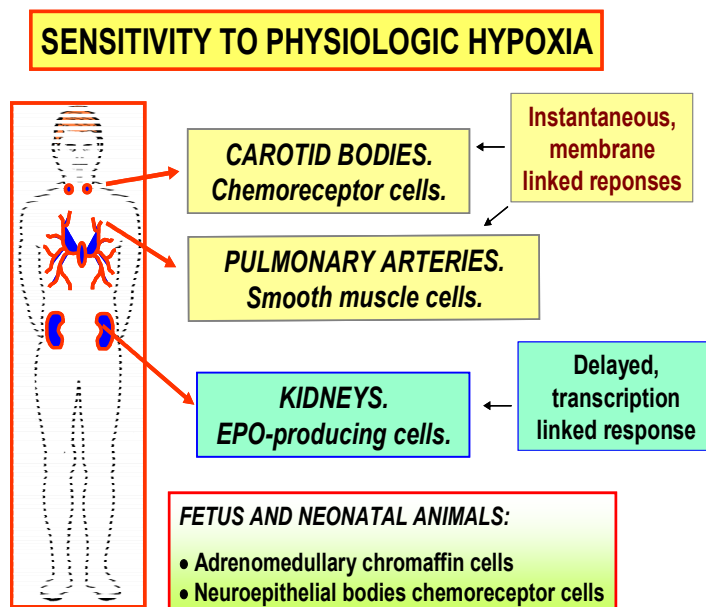
baja: la intolerancia a las grandes alturas era debida a un déficit de  $O_2$  y no a la disminución de la PB, ni al frío ni a vapores tóxicos. A partir de estas fechas, las expediciones fisiológicas a los Alpes y a los Andes y finalmente al Himalaya llevaron a fisiólogos-exploradores a construir laboratorios de montaña donde estudiaban las respuestas de los miembros de las expediciones a medida que ascendían. Las expediciones médico-fisiológicas a las grandes montañas de nuestro planeta continúan y existen laboratorios estables de fisiología de gran altitud en todas las grandes cordilleras de la Tierra.

La primera respuesta fisiológica registrada en esas expediciones de fisiólogos-exploradores a las grandes alturas fue la policitemia. Viault tras una expedición a los Andes peruanos (4.540 m) constató que los hematíes aumentaban de  $\approx 5$  millones/ $mm^3$  a nivel del mar a 7,5-8 millones/ $mm^3$ , percatándose además de que la policitemia ocurría en un corto periodo de tiempo, que no necesitaba una persistencia generacional a grandes alturas. Sin embargo, hasta 1950 no se demostró la existencia de un factor hormonal como responsable de la eritropoyesis activada por la hipoxia. Reissmann (1950) describió que los dos miembros de pares de ratas parabióticas desarrollaban hipertrofia normoblástica de la médula ósea, aún cuando sólo uno de ellos respiraba una atmósfera pobre en  $O_2$ . Experimentos con animales nefrectomizados y observaciones clínicas en pacientes con insuficiencia renal crónica llevaron a identificar al riñón como la principal fuente de la hormona que controla la eritropoyesis, y que hoy conocemos como eritropoyetina (EPO).

La hiperventilación como respuesta a la hipoxia de grandes alturas no cabe duda que fue apreciada en las expediciones de los Jesuitas, aunque fue Gay-Lussac (1778-1850), quien en sus vuelos en globo para verificar diversos aspectos de las leyes de las presiones de los gases, llegó a ascender a 7.000 m y describió : "*Having arrived at the most elevated point of my ascent, 21,000 feet above sea level, my respiration was rendered sensibly difficult, but I was far from experiencing any illness of a kind to make me descend. My pulse and my breathing were very quick; breathing very frequently in an extremely dry atmosphere, I should not have been surprised if my throat had been so dry as to make it painful to swallow bread*" (Marion, 2004). El fisiólogo alemán, F.W. Pflüger en 1868 describió la hiperventilación producida al respirar nitrógeno puro y Boycott y Haldane (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. Se desconocía cómo la disminución de la  $PaO_2$  producía la hiperventilación. Pero como hemos escrito en la primera sección no fue hasta 1928-1930 cuando Fernando de Castro y Corneille Heymans en Gante (Bélgica) descubrían que la hiperventilación que originaba la hipoxia era refleja, y que el reflejo se originaba en la región del seno carotídeo.



Se acepta que la tercera y última respuesta a la hipoxia hipóxica fue descubierta en 1946. Sin embargo, Bradford y Dean en 1894 ya habían descrito en perro que la asfixia producida por parada del respirador generaba un aumento de la presión pulmonar que pudieron independizar de los cambios en la presión sistémica. Fueron von Euler y Liljestrand (1946) los que observaron un aumento en la presión arterial pulmonar (PAP) en el gato al respirar una mezcla de gases hipóxica. Pronto se verificó que esta respuesta ocurría en otras especies, incluido el hombre, y que los residentes a grandes alturas presentaban hipertensiones pulmonares, que aunque moderadas eran proporcionales a la altura. El aumento de la PAP se genera por un aumento del tono de las propias fibras musculares lisas de los vasos arteriales pulmonares. La vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH) es, por tanto, una propiedad intrínseca y específica de las fibras musculares de las arterias pulmonares.

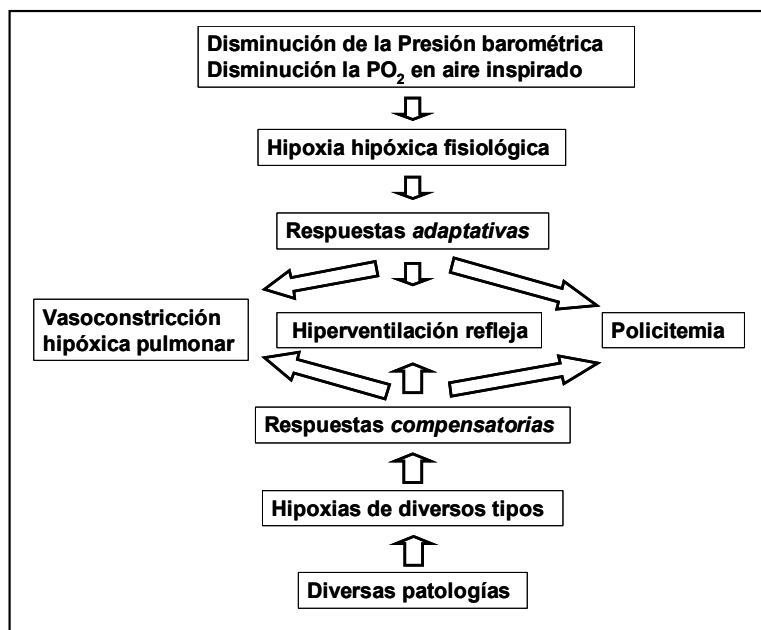


**Figura 6.** Grupos celulares con umbral bajo a la hipoxia, esto es, capaces de activarse con niveles de hipoxia moderados. Estos grupos celulares detectan la hipoxia en su medio interno íntimo y generan respuestas dirigidas a mantener o restaurar una disponibilidad de  $O_2$  adecuada para todo el organismo. Como muestra el esquema, en el feto, durante el parto y en el animal recién nacido tienen gran interés la sensibilidad hipóxica de la médula adrenal y de los cuerpos neuroepiteliales del árbol traqueobronquial que en conjunto juegan un papel importante en la adaptación a la vida extrauterina (González et al., 2010).

Si exploráramos a personas sanas que ascienden a alturas de hasta 4.000 m y permanecen a esa altura durante días o semanas, o a nativos sanos residentes a esas alturas, y les comparamos con controles adecuados que viven al nivel del mar, nos encontraríamos que de forma constante presentan policitemia, hiperventilación e hipertensión pulmonar moderada. Si tenemos en cuenta que la adaptación es un ajuste en la estructura o en la función, por la que un individuo (o una especie) mejora su condición en relación con el medio, concluiríamos que estas modificaciones son respuestas adaptativas que ayudan al individuo a defenderse de la propia hipoxia fisiológica de grandes alturas.

En realidad estas respuestas son, en lo esencial, comunes a cualquier tipo de

hipoxia (Figura 7). Sin embargo, en los demás tipos de hipoxia estas respuestas son compensatorias de un proceso patológico, y no ha de olvidarse que una compensación es el aumento en tamaño o actividad de una parte de un organismo o un órgano para satisfacer la pérdida de función o la disfunción de otro órgano. Las respuestas adaptativas son propias de organismos sanos, las compensatorias lo son de organismos enfermos. (Figura 7). Además, las hipoxias patológicas se acompañan de la cohorte de respuestas compensatorias desencadenadas por la propia patología.



**Figura 7.** Respuestas a la hipoxia en el animal adulto. En la hipoxia hipóxica fisiológica, las respuestas son adaptativas y conforman la triada recogida en el esquema. En las hipoxias patológicas las respuestas compensatorias no siempre involucran las tres respuestas pudiendo aparecer otras respuestas compensatorias en otros sistemas o aparatos, p.e., respuestas cardiovasculares y respuestas celulares mucho más difusas si la hipoxia es severa. (Tomado de Obeso et al., 2006).

### 3.3.2. Vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH).

El significado adaptativo de la VPH generalizada típica de la hipoxia fisiológica no es siempre aceptado. Sin embargo, todo el mundo estaría de acuerdo en 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 el 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 regionales o que afectan incluso a uno de los pulmones completos juega un papel decisivo en la optimización de las relaciones ventilación/perfusión del pulmón considerado como un todo. La VPH en los sectores pulmonares enfermos mal ventilados en los que la  $P_{A}O_2$  es baja minimiza su perfusión y fuerza el flujo sanguíneo hacia las áreas pulmonares bien ventiladas para optimizar el

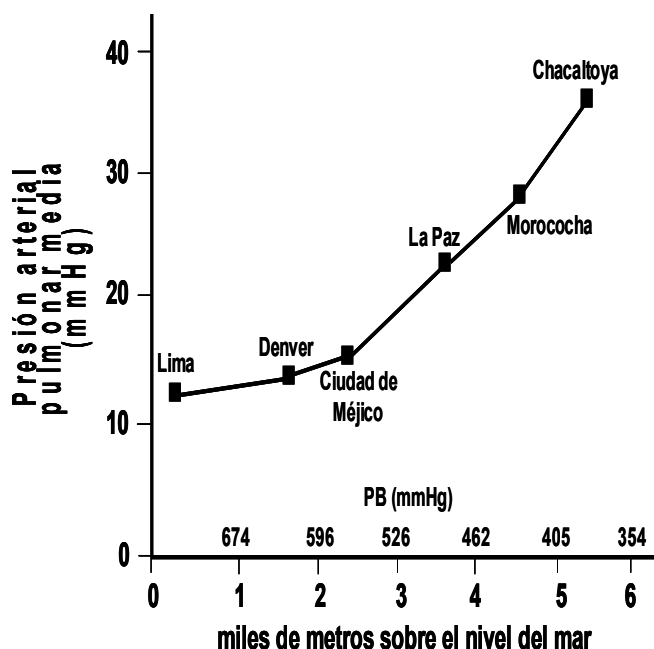
intercambio gaseoso. Los intensivistas conocen muy bien que los potenciadores de la VPH mejoran la PaO<sub>2</sub> en muchos cuadros clínicos con desequilibrios ventilatorios exagerados. Paradójicamente la administración de óxido nítrico inhalado, que es un potente vasodilatador de la circulación pulmonar, 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. Pero la cuestión sigue en pie: es la VPH generalizada de la hipoxia hipóxica fisiológica o de grandes alturas una respuesta adaptativa útil o no.

La primera clave de la respuesta a la pregunta pasa por definir la magnitud de la VPH que se encuentra en situaciones de hipoxia fisiológica y el grado de hipertensión pulmonar que ella genera, que, como muestra la Figura 8, se trata de hipertensiones moderadas incluso a muy grandes alturas. Datos comparables han sido obtenidos en estudios más recientes (Scherrer et al., 1996; Ghofrani et al., 2004; Cornolo et al., 2004). En suma, los aumentos de PAP generados por la VPH son moderados y considerablemente menores a los encontrados en múltiples series de pacientes con patología pulmonar en los que además de un componente hipóxico se añaden como factores patogénicos de la hipertensión pulmonar la exposición a tóxicos, componentes inflamatorios-infecciosos con hiperactivación de los sistemas fagocíticos, insuficiencia cardíaca izquierda, etc.

Un segundo aspecto a considerar es si este nivel de VPH causa efectos deletéreos. Los trabajos pioneros de Arias-Stella mostraron que los nativos a grandes alturas presentan hipertrofia ventricular derecha, consecuencia directa del aumento de la PAP. Estudios electrocardiográficos en alpinistas confirman las observaciones en nativos de grandes alturas ya que en unas pocas semanas aparece cierto grado de hipertrofia ventricular derecha y, en altitudes extremas, alteraciones en la conducción de rama derecha. No nos consta que esta hipertrofia tenga consecuencias perjudiciales "*quo ad vitam*" y como discuten Rubin y Naeije (2004) en un editorial parece cuestionable que los aumentos de PAP hasta altitudes de 5.245 m y desde luego hasta altitudes de 4.000 m (equivalente a una fracción de O<sub>2</sub> en aire inspirado a nivel del mar del 12%) produzcan ninguna limitación en reposo ni pérdida de la tolerancia a la actividad física.

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 et al. (1995) las incidencias de aparición de edema pulmonar son del 2.5% a 4.243 m y del 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 y educado a los alpinistas la incidencia de edema disminuyó. Así pues, 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 (Ward et al., 1995).



**Figura 8.** Niveles de PAP media en nativos residentes a distintas alturas sobre el nivel del mar. En nativos a gran altura del Tíbet la PAP es menor que en los nativos de Norte y Sur America (Groves et al., *J. Appl. Physiol.* 74:312-318, 1993). Se indican también los niveles de PB. La  $PO_2$  en aire inspirado humidificado en tráquea sería:  $PO_2 = (PB-47) \times 0.2093$ ; y la presión alveolar de  $O_2$  ( $P_{AO_2}$ ) de no existir compensación ventilatoria sería:  $P_{AO_2} = (PO_2 \text{ en tráquea}) - (1.2 \times P_{ACO_2})$ ;  $P_{AO_2} = (PO_2 \text{ en tráquea}) - (1.2 \times 40)$ . Estos datos corresponden a una situación de *steady state* asumiendo un cociente respiratorio de 0.8; con un cociente respiratorio de 1, determinaría que el segundo término de la ecuación se correspondería exactamente con los 40 mmHg de la  $P_{ACO_2}$  (tomado de Cudkowicz, L. *Respiration.* 27:417-30, 1970).

Sin embargo, la clave radica en identificar los efectos beneficiosos de la VPH de grandes alturas. Existen pocos estudios en los que se haya abordado directamente este problema. El beneficio de la VPH, entendemos nosotros, habría de venir de una mejoría en la saturación de la Hb, aunque tal vez, ésta no sea la única vía por la que la VPH, que aparece de forma adaptativa en las hipoxias sostenidas, contribuya a una mejor tolerancia a las alturas, sin embargo no existen datos sobre cual o cuales podrían ser estas vías (ver más adelante).

Existen para nuestro conocimiento tres estudios que abordan de forma directa el problema exponiendo a los sujetos a hipoxia y estudiando en ellos (o en subgrupos de ellos) el efecto de vasodilatadores de la circulación pulmonar sobre una serie de parámetros. Scherrer et al. (1996) seleccionaron 17 montañeros controles sin historia previa de edema pulmonar de alturas y 18 con antecedentes en los cuatro años previos de algún episodio de edema pulmonar en expediciones a la montaña. En los sujetos controles la administración de NO (40 partes por millón) tras 2 días a 4.559 m redujo la PAP sistólica de 43 a 34 mmHg y produjo una tendencia no significativa a disminuir la  $PaO_2$  y la saturación la Hb. De los 18 montañeros con antecedentes de edema pulmonar, 8 no mostraron signos radiológicos del mismo en la expedición del estudio y en ellos la PAP

sistólica alcanzó 67 mmHg y el NO la redujo a 42 mmHg de nuevo con una tendencia a empeorar la PaO<sub>2</sub>. Los 10 sujetos restantes desarrollaron edema, su PAP sistólica fue de 66 mmHg que el NO redujo a 40 mmHg además de mejorar significativamente la PaO<sub>2</sub> (de 36 a 41 mmHg) y la saturación de la Hb (del 67 al 73%). Finalmente en un estudio de hipoxia aguda (12 min., 10% O<sub>2</sub>) en 6 sujetos controles, la inhalación de NO disminuyó la PAP sistólica (54 a 31 mmHg) y empeoró significativamente la saturación de la Hb (67 a 62%) y en los 8 sujetos con historia de edema, pero que no lo habían desarrollado, el NO bajó la PAP de 46 a 34 mmHg y empeoró significativamente la saturación de la Hb del 67 al 62%. La conclusión que estos autores sacaron de su estudio fue que tal vez los sujetos con edema o tendencia al edema y en los que el NO fue beneficioso lo que presentan en realidad es una “adaptopatía” tal vez debida a una expresión-activación anómalamente baja de la sintasa de NO (ver Bartsch et al. 2005).

Ghofrani et al. (2004) realizaron estudios a nivel del mar en normoxia y tras 2 horas de exposición a hipoxia aguda (10% O<sub>2</sub>), en reposo y en ejercicio en ambas condiciones; continuaron los estudios tanto en reposo como en ejercicio con los mismos sujetos tras un ascenso reglado de 8 días de duración hasta 5.245 m y seis días de aclimatación a esta altura. Tanto en los estudios a nivel del mar como a grandes alturas los sujetos se dividieron en dos grupos: control o placebo y sujetos tratados con sildenafil<sup>1</sup> (50 mg en dosis única 1 h antes de la realización de los tests). Los hallazgos no permiten deducir que la VPH y consiguiente hipertensión pulmonar tenga un efecto beneficioso sobre la oxigenación de la sangre, y por tanto, no está claro el significado adaptativo de la VPH. Conclusiones similares obtienen Richalet et al. (2005) también utilizando sildenafil que limitó la hipoxemia de grandes alturas y redujo la hipertensión pulmonar, esto es, la VPH no es beneficiosa, sino deletérea, y por tanto *sensu stricto* no se la puede atribuir el carácter de una respuesta adaptativa. Sin embargo, cuando comparamos los tres estudios resulta obvio que frente al NO inhalado que tiene sólo o preferencialmente efectos locales a nivel pulmonar el tratamiento con sildenafil produce mejorías tanto mayores cuanto más largo es el tratamiento y tal vez ello implique que los efectos beneficiosos del sildenafil no dependen de su acción sobre la VPH sino sobre otras estructuras del organismo.

En suma, el carácter adaptativo de la VPH, como respuesta útil para el organismo en la hipoxia hipóxica generalizada de grandes alturas no es fácilmente evidenciable.

---

<sup>1</sup> El sildenafil es el principio activo de la viagra. Su actividad farmacológica depende su especificidad para inhibir la fosfodiesterasa-5 que degrada el GMPc. El GMPc a su vez se genera por la activación de la guanilatociclasa por el NO. El NO a través del GMPc es un potente vasodilatador, siendo muchas las dianas intracelulares de este nucleótido cíclico (ver Figura 2 en Hampl y Herget *Physiol. Rev.* 80:1337-1372, 2000).

Parece sin embargo que los estudios con sildenafil no son clarificadores, ya que los efectos de mejoría introducidos por el tratamiento con esta droga parecen deberse más a efectos sistémicos que a su efecto vasodilatador de la circulación pulmonar. Por el contrario los efectos del NO inhalado ponen de manifiesto que en sujetos normales la VPH es beneficiosa ya que su supresión con NO empeora la oxigenación de la sangre. Además, el transporte del NO generado en los pulmones como consecuencia de la VPH tal vez mejore el rendimiento cardiaco y ello constituya una vía adicional por la que la VPH ayuda al organismo a adaptarse al medio. Probablemente la conclusión de Marshall et al. (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. En la revisión reciente de Sylvester et al., (2012) no se añaden ideas nuevas excepto tal vez que se enfatiza la posible adaptopatía de los sujetos que sufren edema de grandes alturas consistente en una escasa producción de NO por parte del endotelio tal y como hemos mencionado previamente. Señalan en este sentido que los nacidos-residentes en Tíbet, que no presentan edema de grandes alturas tienen altos niveles de NO en sus exhalados pulmonares en comparación con los residentes a nivel del mar.

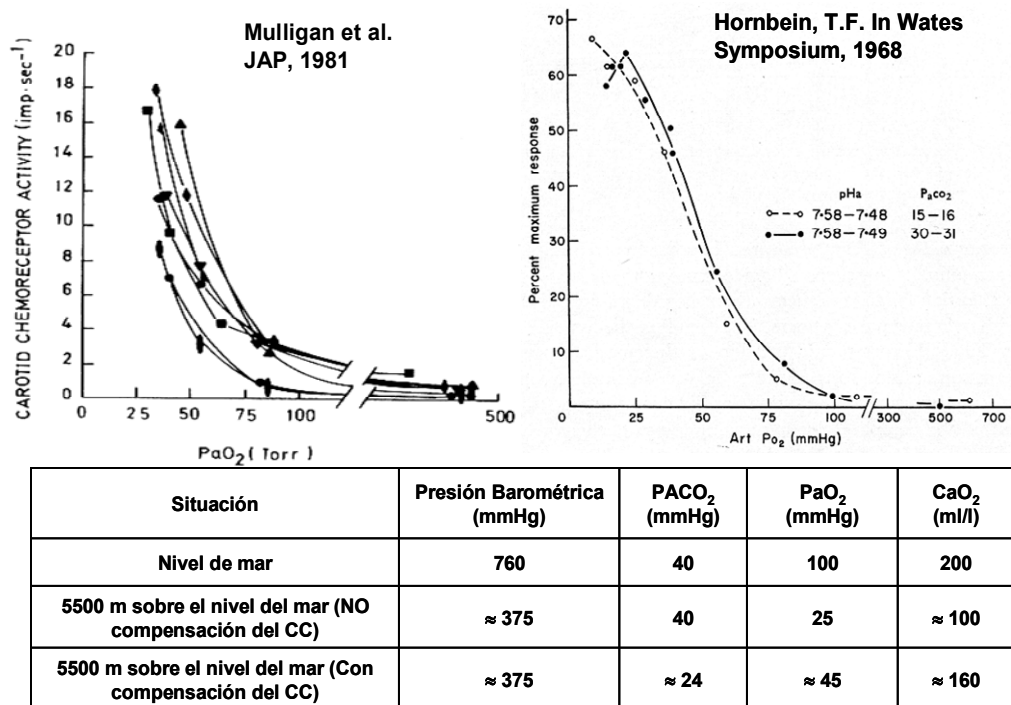
### **3.3.3. Hiperventilación en respuesta a la hipoxia hipóxica.**

Según propuso Fernando de Castro, pero enunciado en terminología actual, podríamos decir que las CQ del cuerpo carotídeo se activan instantáneamente cuando disminuye la  $P_{aO_2}$  y aumentan la liberación de neurotransmisores; éstos activan a las terminaciones sensoriales del NSC incrementando su frecuencia de descarga; estos impulsos activan al centro respiratorio y se produce un aumento proporcional de la ventilación pulmonar. Si retomamos ahora los datos que dábamos en la sección 3.2 para un sujeto a 4.000 m sobre el nivel del mar, tendríamos que su  $P_{AO_2}$  sería de 47 mmHg, su  $P_{aO_2}$  de en torno a 42 mmHg y su  $P_{ACO_2}$  de 40 mmHg. La hipoxia activaría los CC produciendo una hiperventilación que haría descender la  $P_{ACO_2}$  en unos 10 mmHg y por tanto haría aumentar la  $P_{AO_2}$  y la  $P_{aO_2}$  en unos 12 mmHg, pasando a 59 y 54 mmHg, respectivamente. Con esta hiperventilación, que es moderada (p.e., de 6 a 9.5 l/min), la saturación de la Hb aumentaría del 77% al 86%. Al hablar de la policitemia, calcularemos el efecto neto que este cambio representa para la oxigenación de los tejidos.

Un aspecto muy importante de esta respuesta hiperventilatoria originada en el cuerpo carotídeo es su umbral (Figura 9). Cuando la  $P_{aO_2}$  es de en torno a 70 mmHg (equivalente a una  $P_B$  de  $\approx 600$  mmHg y una altitud de 2.000 m), los CC comienzan a

activarse y a aumentar ligeramente la ventilación. Si consideramos que a esa PaO<sub>2</sub> 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 esta figura es que a PaO<sub>2</sub> inferiores a 40-45 mmHg, disminuciones ligeras de la PaO<sub>2</sub> producen aumentos marcados de la ventilación. Es precisamente este carácter exponencial de la hiperventilación mediada por el CC lo que ha permitido conquistar el Everest sin suplementación de O<sub>2</sub>.

Se puede calcular la P<sub>A</sub>O<sub>2</sub> en la cima del Everest sabiendo que su altura es de 8848 m y su P<sub>B</sub> de 253 mmHg, y que la hiperventilación mediada por el CC alcanza 40 l/min ó más y reduce la P<sub>A</sub>CO<sub>2</sub> a 7,5 mmHg. Ello posibilitaría que la P<sub>A</sub>O<sub>2</sub> suba hasta 35 mmHg. De hecho tales medidas han sido hechas experimentalmente en una de las expediciones médicas al Everest (West, 2010).



**Figura 9.** Relación entre PaO<sub>2</sub> y actividad en el NSC en gato y ventilación pulmonar en humano. Nótese el umbral de ambas respuestas a ≈75 mmHg y la subida exponencial de las mismas a medida que disminuye la PaO<sub>2</sub>. La ventilación a nivel del mar (PaO<sub>2</sub> = 100 mmHg) es de ≈5 l/min y la actividad basal (frecuencia de potenciales de acción en fibras únicas del NSC, 2 a 3 potenciales/s) a la misma PO<sub>2</sub>. Por tanto, la ganancia máxima de ambas respuestas es de 8 a 10 veces la basal. En la tabla que acompaña a la figura pueden verse valores aproximados de la compensación ventilatoria para la PaO<sub>2</sub> y contenido arterial de O<sub>2</sub> (CaO<sub>2</sub>). Nótese que la hiperventilación lo que hace es lavar los pulmones de CO<sub>2</sub>, haciendo posible de acuerdo con la ecuación de la PO<sub>2</sub> alveolar dada en la leyenda de la Figura 8, que la PAO<sub>2</sub> aumente aproximándose a la PO<sub>2</sub> en aire inspirado.

El carácter adaptativo, y por tanto beneficioso, de la hiperventilación mediada por el

CC es universalmente aceptada. No pasamos a considerar los efectos de la alcalosis resultante de la hiperventilación sobre la afinidad de la Hb por el O<sub>2</sub>, ya que los ajustes metabólicos del hematíe aumentando los niveles de 2-3-difosfoglicerato corrigen estos cambios en unos pocos días. En este contexto queremos citar textualmente la conclusión de un trabajo de Timmers et al. (2003): *“Therefore, although carotid baroreceptors contribute to short-term blood pressure control, other receptors are able to maintain normal chronic blood pressure levels in the absence of carotid baroreceptors. Conversely, carotid chemoreceptor denervation leads to permanent abolition of normocapnic ventilatory responses to hypoxia and reduced ventilatory responses to hypercapnia”*.

La conclusión de Timmers pone de manifiesto la escasa o nula importancia de los cuerpos aórticos en las respuestas a la hipoxia hipóxica, aunque como demostraran Lahiri y colaboradores a principios de los años 80, los cuerpos aórticos son los responsables de los ajustes principalmente circulatorios que se producen en las hipoxias anémicas y de estasis (Lahiri et al., 1980, 1981; ver González et al., 1994). La hipoxia hipóxica también produce efectos cardiovasculares que varían según la especie animal, la intensidad de la hipoxia aplicada y el protocolo experimental utilizado, incluyendo si el animal fue o no anestesiado y el tipo y dosis de anestesia (ver González et al., 1994). Sin embargo, la génesis de las respuestas cardiovasculares a la hipoxia es multifactorial y no siempre es fácil definir con exactitud la contribución de cada factor a las respuestas observadas. Por ejemplo, la denervación del CC para determinar su contribución al control cardiovascular durante la hipoxia puede producir eliminación parcial o total de los barorreceptores carotídeos, que juegan un papel crítico en el control del sistema cardiovascular y además, elimina la hiperventilación hipóxica que contribuye de forma importantísima a la génesis de las respuestas cardiovasculares.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, parece ser que en primates y en el hombre a todos los niveles de hipoxia hipóxica se produce taquicardia, aumento del gasto cardíaco y vasodilatación periférica (Fitzgerald y Shirahata, 1997; Coleridge et al., 1997). Por lo tanto, en una hipoxia de corta duración, la relación entre gasto cardíaco/consumo total de O<sub>2</sub> aumenta. En el laboratorio es posible disecar parcialmente la génesis de estas respuestas. Así, una estimulación selectiva del CC (perfundiendo a presión idéntica a la arterial y de forma selectiva el seno carotídeo con sangre hipóxica), mientras se controla la ventilación con un respirador, produce vasoconstricción periférica, bradicardia y disminución del inotropismo del ventrículo izquierdo (Kumar, 2009). Esto es, los efectos directos más significativos de la estimulación del CC sobre el sistema cardiovascular son bradicardia, disminución de la contractilidad cardíaca y vasoconstricción periférica. Estos efectos



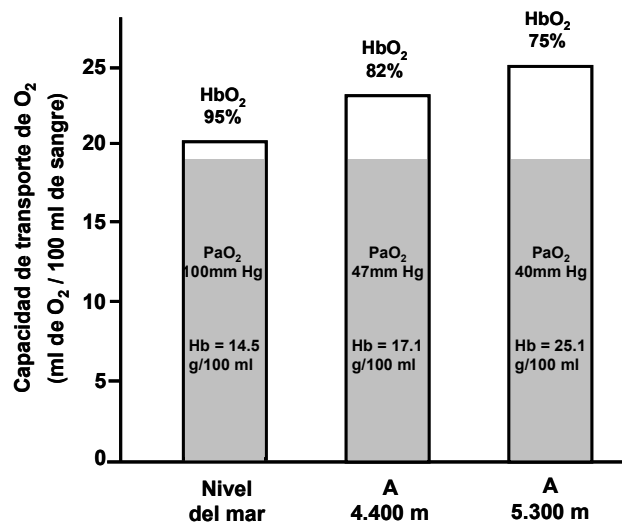
cardiovasculares parecen hacer inservible el aumento de la ventilación: de nada serviría bombear más  $O_2$  a los pulmones si el aparato circulatorio no lo lleva a los tejidos. Sin embargo, otros mecanismos reguladores sobrepasan a los efectos directos del CC sobre el sistema cardiovascular para conseguir una respuesta coordinada de los aparatos respiratorio y circulatorio, i.e., para obtener durante la hipoxia un aumento de la velocidad del bombeo de aire rico en  $O_2$  a los pulmones y un aumento de la velocidad de aporte de  $O_2$  a los tejidos por el sistema circulatorio. De hecho, se piensa que el efecto directo cronotrope negativo del reflejo quimiorreceptor tiene una función protectora del miocardio en situaciones de hipoxia. Si se desconecta a los animales del respirador y se les deja que respiren espontáneamente, a esa estimulación inicial de los CCs le sigue una hiperventilación. La hiperventilación, modificando la presión intratorácica, afecta al retorno venoso y a la contractilidad cardíaca, y activando el reflejo de inflación pulmonar, modifica aún más la función cardiovascular. En su conjunto, los efectos originados en el pulmón sobrepasan los efectos directos del CC con el resultado neto de taquicardia y una tendencia a la vasodilatación periférica. Finalmente cuando todo el animal es sometido a hipoxia, como ocurre de forma natural, los efectos directos de la hipoxia sobre el corazón y los vasos sanguíneos se añaden a los mecanismos de control previos. La hipoxia hipóxica de baja intensidad puede tender a aumentar la contractilidad cardíaca, pero hipoxias moderadas o intensas van a tender a producir un efecto inotrópico negativo; la hipoxia produce vasodilatación en todos los lechos vasculares, excepto en la circulación pulmonar donde la  $PO_2$  alveolar baja produce vasoconstricción. La suma de estos mecanismos unitarios constituye la respuesta a la hipoxia aguda descrita anteriormente, i.e., taquicardia, aumento del gasto cardíaco y vasodilatación periférica. La vasodilatación periférica se ve compensada por efecto directo del reflejo quimiorreceptor que activa el simpático y también por acción del reflejo barorreceptor que se opone a la hipotensión generada por la acción directa de la hipoxia (Kumar, 2009). En hipoxias sostenidas, el aumento de la ganancia del reflejo quimiorreceptor (aclimatación) atenúa la taquicardia, y contribuye a que tienda a normalizarse el cociente gasto cardíaco/consumo total de  $O_2$ , lo cual según se ha comentado tendría un papel protector sobre el miocardio.

#### **3.3.4. La policitemia.**

Según muestra la Figura 10, la policitemia por un lado, más la hiperventilación por otro, hacen que el  $CaO_2$  sea normal hasta alturas de al menos 5.300 m sobre el nivel del mar. La policitemia de grandes alturas es normocítica por lo que el aumento del número de hematíes produce un aumento proporcional de la concentración de Hb. Es evidente que un

aumento de la [Hb], aún cuando la  $PaO_2$  esté disminuida, aumenta el  $CaO_2$ . El umbral de hipoxia para aumentar la producción de EPO es comparable al descrito para la activación del CC, de tal forma que con  $PaO_2$  de en torno a 70-75 mmHg (a unos 1.800-2.200 m sobre el nivel del mar) comienza a haber un aumento en la secreción de eritropoyetina. Dado que el aumento de la [Hb] producido por la hipoxia es aproximadamente proporcional a la disminución de la  $PaO_2$ , la capacidad de la sangre para transportar  $O_2$  es idéntica a la que posee la sangre a nivel del mar. En un sujeto normal a nivel del mar con una  $PaO_2$  de 100 mmHg, el  $CaO_2$  es de  $\approx 189$  ml de  $O_2/l$  de sangre ( $CaO_2 = 145 \times 1,34 \times 97,5/100 = 189$  ml de  $O_2/l$  de sangre; 145 es la concentración de Hb en g/l; 1.34 capacidad máxima de la Hb para transportar  $O_2$  en ml  $O_2/g$  de Hb; 97,5/100 es el tanto por ciento de saturación de la Hb a la  $PaO_2$  normal de 100 mmHg). Sin embargo, no hay que olvidar que el parámetro importante para definir la hipoxia es la  $PO_2$  tisular. Con consumos de  $O_2$  normales (250 ml/min) y un gasto cardiaco normal de 5,5 l/min, sabemos que a nivel del mar la  $CaO_2 - CvO_2$  es de en torno a 45 ml de  $O_2$ , que la saturación de la Hb en sangre venosa es próxima al 75% y que la  $PvO_2$  media es de 40 mmHg, y por tanto la  $PO_2$  tisular media podría acercarse a 40 mmHg. A 4.400 m (aún asumiendo un consumo de  $O_2$  y un gasto cardiaco idénticos, aunque sabemos que el gasto cardiaco está moderadamente aumentado), habríamos de tener la misma  $CaO_2 - CvO_2$  de 45 ml de  $O_2$  para satisfacer el consumo de  $O_2$  corporal y dado que el  $CaO_2$  es el mismo, 190 ml/l de sangre, el  $CvO_2$  tiene que ser de 145 ml  $O_2/l$  de sangre.

La saturación de la Hb en la sangre venosa a 4.400 m será:  $145 \text{ ml } O_2/l = 171 \text{ g de Hb/l} \times 1.34 \text{ ml } O_2/g \times \% \text{ Sat}$ ; lo que nos da una saturación del 63.3%. A esa saturación le corresponde una  $PO_2$  de  $\approx 34$  mmHg que sería la  $PvO_2$  media y la  $PO_2$  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  $PaO_2$  entre el nivel del mar y los 4.400 m (ver Figura 5), sea sólo de 6 mmHg a nivel de  $PO_2$  tisular. Teniendo en cuenta el aumento moderado del gasto cardiaco, esta diferencia se reduciría. Dos comentarios finales a estos cálculos: primero, a 4.400 m el ejercicio físico produce una hiperventilación (añadida a la ya existente por la hipoxia) y un aumento del gasto cardiaco que son comparables (o ligeramente superiores) a los que se observan a nivel del mar, con lo que la disminución de la  $PvO_2$  y de la  $PO_2$  tisular en el ejercicio es comparable en ambas situaciones; y segundo, es evidente que el nivel máximo de ejercicio tolerable es mayor a nivel del mar que a 4.400 m.



**Figura 10.** Se presenta la capacidad de la sangre para transportar O<sub>2</sub> al nivel del mar, a 4.400 m y a 5.300 m. Es evidente que aún cuando la hiperventilación mediada por el CC consigue aumentar la PaO<sub>2</sub>, la saturación de la Hb cae a medida que ascendemos, pero la policitemia posibilita que el O<sub>2</sub> transportado por litro de sangre sea esencialmente idéntico en las tres situaciones (19 ml de O<sub>2</sub>/100 ml de sangre). (Datos obtenidos de Reynafarje, *J. Appl. Physiol.* 17: 301-305, 1962) y a 5.300 m datos obtenidos de Ward et al. (1995).

El coste energético de estos cambios adaptativos es escaso. El aumento del consumo de O<sub>2</sub> impuesto por la hiperventilación supone unos pocos ml/min, ya que según hemos mencionado la hiperventilación a 4.400 m es moderada. La policitemia es también moderada con lo que el aumento de la viscosidad de la sangre, y por tanto de resistencias al flujo sanguíneo y de trabajo del corazón son igualmente pequeños. Sin embargo, existe una enfermedad típica de alta montaña, la enfermedad de Monge, caracterizada por hipoventilación (relativa a la ventilación que presentan los sujetos normales a la misma altura), policitemia muy intensa, hipertensión, disminución del gasto cardiaco y cianosis permanente. En opinión del propio Monge, nos hallamos ante una adaptopatía (Monge y León-Velarde, 1992). La alteración primaria residiría en el CC o en el centro respiratorio que no generan la hiperventilación que corresponde a la PO<sub>2</sub> arterial encontrada a esa altura. La hipoventilación relativa genera un nivel de hipoxia y una respuesta hematopoyética muy superiores a las que corresponde a esa altura. Los síntomas serían el resultado de la hipoxia intensa (la cianosis), y del aumento de la viscosidad de la sangre por el aumento exagerado (>60%) del hematocrito. Tal vez contribuya a esta adaptopatía la hipertensión pulmonar exagerada por déficit en la expresión de NOS con edema intersticial como ya hemos comentado.

### 3.3.5. Otras respuestas a la hipoxia hipóxica.

**3.3.5.1. Respuestas endocrinas.** En terneros (de 3 a 5 semanas de vida) despiertos, hay liberación significativa de adrenalina (más que de noradrenalina) en la médula adrenal en respuesta a la hipoxia (30 min.; P<sub>a</sub>O<sub>2</sub> <17 mmHg), siendo la liberación de estas CA comparable a la registrada durante la estimulación máxima de la inervación

simpática de esta glándula en terneros anestesiados; la liberación de CA adrenales evocada por la hipoxia es refleja, ya que es abolida por la sección bilateral de los nervios espláncnicos (Bloom et al., 1976; 1977). La interpretación de estos hechos es que la hipoxia activa el simpático a través del CC, siendo el aumento de CA un reflejo directo de la hipertonia simpática producida por el CC (Fitzgerald y Shirahata, 1997). Datos comparables han sido obtenidos en el perro y en la rata (Biesold et al., 1989; Critchley et al., 1980).

En terneros despiertos, también se ha visto que la hipoxia de 30 min. de duración produce secreción de cortisol y corticosterona que es proporcional a la hipoxia entre 55 y 17 mmHg (Bloom et al., 1976, 1977). Por otra parte, la hipoxia induce aumentos de la ACTH plasmática en la oveja (Boddy et al., 1974) y de ACTH y corticosteroides en perros anestesiados, paralizados y ventilados artificialmente (Raff et al., 1983). La secreción máxima de cortisol evocada en estos perros por hipoxia hipóxica se atenúa considerablemente después de la desaferentación de los CC (Raff et al., 1982). Por ello, la liberación de glucocorticoides adrenales en respuesta a la hipoxia se atribuye a la activación del eje pituitario-adrenocortical (y no a la acción directa de la hipoxia sobre la corteza adrenal; Bloom et al., 1977), y ésta a su vez a la estimulación hipóxica de los CC.

Hay información abundante sobre liberación de vasopresina y excitación de las neuronas vasopresinérgicas de los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo en respuesta a la estimulación del CC en diferentes especies y condiciones (ver Fitzgerald y Shirahata, 1997 para referencias). Esto explica la elevación de la tasa de excreción urinaria de hormona antidiurética (de hasta 10 veces el valor control) en humanos durante las primeras 24 h de hipoxia de permanencia en una cámara hipobárica (Claybaugh et al., 1982), lo que no se acompañó de cambios en el flujo urinario diario en los sujetos que presentaron hipocapnia, pero que disminuyó a la mitad en aquéllos en que se mantuvo la normocapnia (aumentando la concentración de CO<sub>2</sub> en la cámara para prevenir la alcalosis respiratoria provocada por la hiperventilación). La hipoxia también disminuye la aldosterona plasmática, sin cambios de la renina plasmática, ni del enzima conversor de la angiotensina (Colice y Ramírez, 1985).

**3.3.5.2. Resistencias de las vías aéreas e hipoxia.** La estimulación del CC produce por vía refleja contracción de la musculatura traqueobronquial y un aumento de las resistencias aéreas (Nadel y Widdicombe, 1962). En el animal intacto, la hipoxia que relaja la musculatura traqueobronquial, contrarrestaría el efecto reflejo constrictor, minimizando el aumento de resistencias (Sant'Ambrogio, 2002). De otro lado el efecto reflejo interacciona

positivamente con histamina y metacolina, aumentando el efecto constrictor de la musculatura traqueobronquial que tienen estas drogas (Denjean et al., 1991).

### **3.3.6. Respuestas a la hipoxia en el neonato.**

Aunque hay diferencias entre las distintas especies animales, un hecho bien conocido es que el CC y/o el reflejo quimiorreceptor no es funcional, o lo es de forma incompleta (ver Donnelly, 1997; Gauda et al., 2009) en el momento del nacimiento. Voy a referirme a unos pocos datos sobre la maduración del CC y de la influencia que sobre este proceso tienen ciertas maniobras experimentales. En corderos es posible registrar actividad quimiorreceptora en el NSC intraútero, pero una vez alumbrados (por parto vaginal o cesárea) se registra actividad barorreceptora pero no quimiorreceptora en el NSC, apareciendo la actividad quimiorreceptora sólo dos días después (Blanco et al., 1984); ello se debe a que la hiperoxia relativa de la vida extrauterina en comparación con las condiciones intraútero silencian a los quimiorreceptores transitoriamente. Si en corderos de 2 días se seccionan los nervios carotídeos y se extirpa el tejido del área de los CC, se observan al cabo de 1 semana niveles menores de volumen corriente, frecuencia respiratoria y PaO<sub>2</sub>, y mayores de PaCO<sub>2</sub> que los de los corderos sometidos a una operación ficticia (Bureau et al., 1985). Mientras los corderos normales de esta edad presentan una respuesta bifásica inmadura a la hipoxia (hiperventilación transitoria seguida de depresión ventilatoria), los corderos privados de CC no presentaron cambios ventilatorios significativos, ni en un sentido ni en otro (Bureau et al., 1985), lo que sugiere que la depresión ventilatoria secundaria de los animales jóvenes no se debe a un efecto central de la hipoxia, sino a una falta de maduración de los CC.

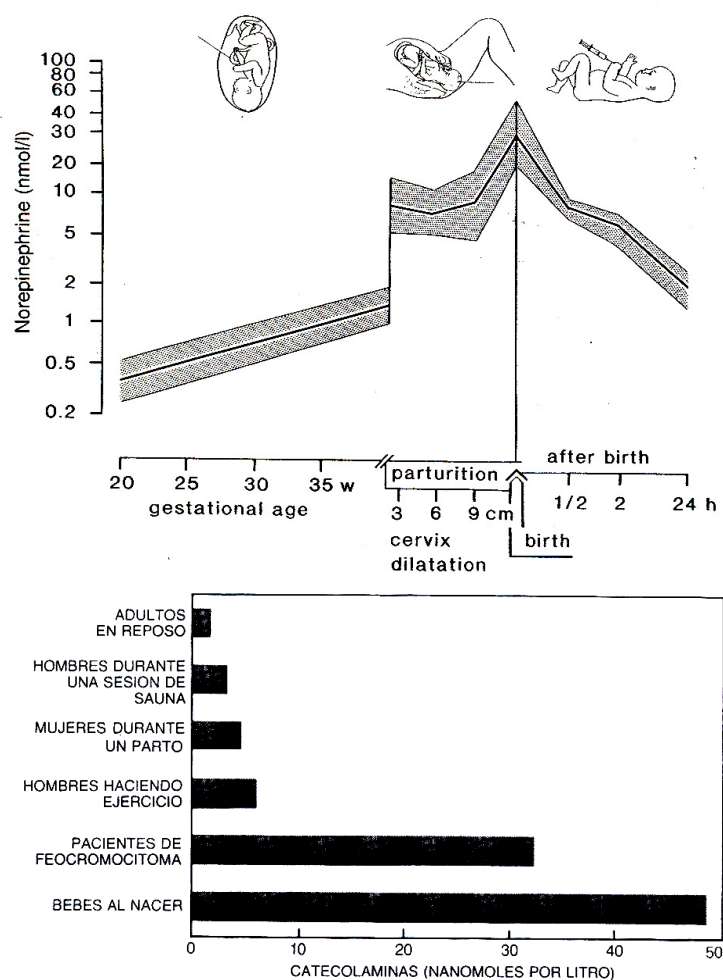
La inmadurez del CC-reflejo quimiorreceptor al nacimiento, caracterizada por una respuesta escasa y transitoria a la hipoxia, o no respuesta en absoluto, se ha constatado en todas las especies estudiadas: cordero, gato, conejo, rata, cerdo y humano (Donnelly, 1997) y deseo centrarme sólo en algunos factores que son decisivos en el proceso de maduración que considero tienen gran interés médico. Así, si se mantiene a animales de experimentación (rata y gato) en atmósfera hipóxica en el periodo intraútero final y postnatal, la respuesta ventilatoria a la hipoxia es bifásica o inmadura (aumento seguido de depresión) durante meses, mientras que en las mismas especies animales en atmósferas normales la maduración de la respuesta hipóxica (caracterizada por hiperventilación sostenida) ocurre en 2-4 semanas (Eden y Hanson, 1987; Hanson y Kumar, 1994). La hipoxia perinatal, si es lo suficientemente sostenida, afecta la maduración del reflejo quimiorreceptor en todas las especies animales, incluido el hombre (Gauda y Lawson,

2000). La hiperoxia perinatal también afecta la maduración del CC. Prieto Lloret et al. (2004) observaron que el mantenimiento de las ratas la última semana de la preñez y el primer mes post alumbramiento en una atmósfera del 30-50% O<sub>2</sub> produce atrofia del complejo CC-NSC, con el resultado de un menor número de células y fibras quimiorreceptoras, y alteración del desarrollo de las CQ, e interferencia con la expresión de la maquinaria involucrada en la detección de la hipoxia en la mayor parte de las CQ supervivientes. En una revisión reciente del tema (Bavis et al., 2013) se concluye: *“...experiments with animal models have revealed that moderate exposures to hyperoxia (e.g., 30-60% O<sub>2</sub> for days to weeks) can also have profound effects on the developing respiratory control system that may lead to hypoventilation and diminished responses to acute hypoxia. ...specifically, developmental hyperoxia reduces carotid body size, decreases the number of chemoafferent neurons, and (at least transiently) diminishes the O<sub>2</sub> sensitivity of individual carotid body glomus cells. Recent evidence suggests that hyperoxia may also directly or indirectly impact development of the central neural control of breathing. Collectively, these findings emphasize the vulnerability of the developing respiratory control system to environmental perturbations”*. La idea detrás de estas reflexiones no es otra que enfatizar la atención que ha de darse al cuidado perinatal de los niños, ya que las disfunciones del CC están íntimamente ligadas al síndrome de la muerte súbita del recién nacido (Pásaro y Ribas, 1997; Gauda et al., 2009).

Hay un episodio de hipoxia muy específico que merece especial consideración, que es el nacimiento propiamente dicho (Figura 11). El nacimiento natural por vía vaginal supone en condiciones normales un episodio de hipoxia muy intensa (de hecho de asfixia), tal vez el más intenso y más prolongado que el nuevo ser vaya a sufrir en su vida y sea capaz de tolerar. Además de que el CC no es funcional, y que por tanto no haya respuestas mediadas por el mismo, razones mecánicas obvias impiden que la ventilación pueda constituir un mecanismo de defensa frente a la hipoxia.

Pero ocurre que en los animales recién nacidos las células cromafines de la médula adrenal son sensibles a la hipoxia. Al igual que el CC no tiene madura su inervación sensorial, la médula adrenal en el neonato tampoco está inervada: las fibras simpáticas pregangliónicas colinérgicas que llegan por el esplácnico no llegan a sinaptar con las células de la médula adrenal en el momento del nacimiento. En rata, la inervación de la médula adrenal se produce durante la segunda semana de vida postnatal (ver Slotkin y Seidler, 1988). Las fibras nerviosas ya están presentes en el segundo día después del nacimiento pero, aunque las células cromafines responden a agonistas colinérgicos, las sinapsis terminación nerviosa-célula cromafín aún no son funcionales ya que no hay respuesta secretora a la estimulación eléctrica del esplácnico

(Holgert et al., 1994). En humanos la maduración de la sinapsis sigue un patrón similar al de la rata ya que al nacer también es inmadura (Lagercrantz & Slotkin, 1986). Pues bien, la médula adrenal neonatal tiene un papel fundamental para la adaptación del organismo a la vida extrauterina, ya que en esta etapa, antes de que se haga efectiva la inervación, las células cromafines poseen la capacidad de detectar directamente situaciones de hipoxia, hipercapnia, acidosis e hipoglucemia (Rico et al., 2005; Rico, 2006) y de responder ante estos estímulos liberando CA al torrente sanguíneo. De hecho, en distintas especies durante el parto vaginal, se produce el mayor pico plasmático de CA de la vida del animal (Figura 11).



**Figura 11.** Parte superior: Niveles de norepinefrina en plasma en la segunda mitad del embarazo, en el momento del parto por vía vaginal y en primer día de vida. Parte inferior: Niveles de CA en plasma en distintas situaciones a lo largo de la vida (modificada de Lagercrantz y Slotkin, 1986).

Este pico de CA no sólo está destinado a proteger al feto del estrés que supone el nacimiento, sino que también se encarga de fortalecer la capacidad del neonato para

desenvolverse eficazmente fuera del organismo materno. Facilita la respiración normal del neonato, aumentando la reabsorción del líquido pulmonar y la secreción de surfactante pulmonar (que reduce la tensión superficial, aumenta la estabilidad alveolar y evita el edema pulmonar). Mejora la elasticidad pulmonar y dilata los bronquiolos. Además, activa la función cardíaca y redirecciona el flujo sanguíneo, aumentándolo hacia los órganos vitales y reduciendo la circulación periférica como medida de protección del corazón y del cerebro. Acelera el ritmo metabólico del feto durante el parto. Con esto se consigue que la energía almacenada, en forma de glucógeno y grasa, pueda ser utilizada por las células del neonato cuando éste deje de recibir el aporte constante de nutrientes a través del cordón umbilical. Las CA estimulan la lipólisis, la glucogenolisis y gluconeogénesis hepáticas. Además, se cree que el pico de CA liberadas durante el parto también puede facilitar la vinculación entre la madre y el hijo, ya que las CA provocan en el recién nacido una actitud de alerta y atención (por ejemplo, dilatación de las pupilas), e incluso en ocasiones cierta sensación de bienestar, que ayudarían al establecimiento de un vínculo materno-filial (Lagercrantz y Slotkin, 1986; Singer, 1999).

### **3.4. Mecanismos moleculares de detección de los estímulos en el CC**

En esta sección se tratarán dos aspectos fundamentales: los mecanismos moleculares de detección de la hipoxia en las CQ, aunque de forma más breve discutamos la detección de la alta  $PCO_2$ /bajo pH, y los mecanismos de comunicación entre las células y las terminaciones nerviosas sensoriales del NSC.

#### **3.4.1. Detección de estímulos por las células quimiorreceptoras.**

Los mecanismos de funcionamiento del CC a nivel celular han constituido un enigma durante muchos años, por lo que han surgido multitud de hipótesis con nombres tales como hipótesis metabólica de la escuela rusa de fisiología y la hipótesis ácida de Winder y de la escuela de Oxford. De ellas la que consiguió mayor difusión fue la teoría metabólica que Anichkov y Belenki'i (1963) enunciaban así: *"...los venenos que bloquean la respiración tisular o la hacen inútil determinan que la síntesis de enlaces de alta energía sea inferior a su degradación, y en consecuencia producen un balance energético negativo en el tejido quimiorreceptor. Por tanto, debe considerarse que la excitación de los quimiorreceptores producida por dichos venenos, que son de naturaleza química muy variada, es la reacción a un balance energético negativo. No hay duda de que la hipoxia, el estímulo fisiológico adecuado para los quimiorreceptores del cuerpo carotídeo, produce un desplazamiento negativo en el balance energético... Es por tanto obvio que el mecanismo íntimo de la excitación hipóxica de los quimiorreceptores tiene que ser similar*



*al mecanismo de excitación producido por los venenos que abolen la respiración celular o la hacen inútil ..."* (tomado de Obeso, 1984).

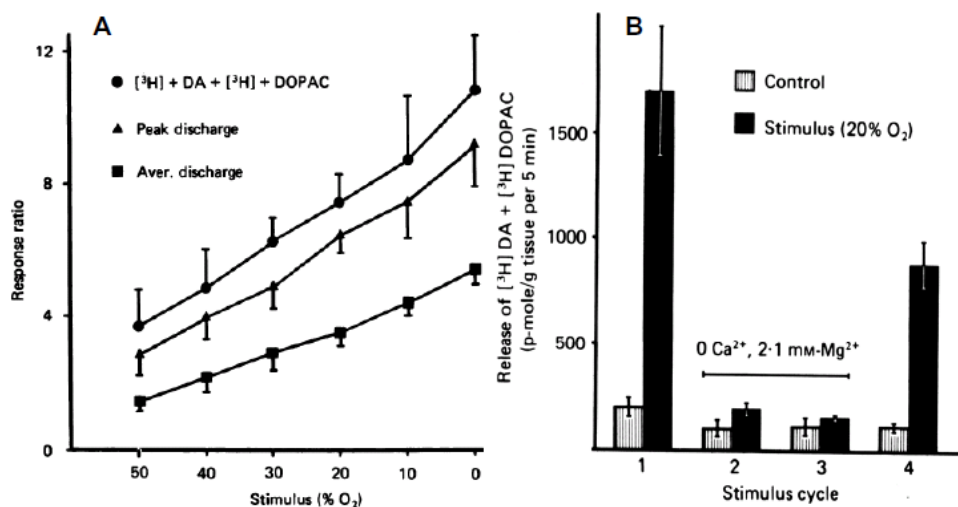
La primera crítica a la hipótesis metabólica surgió al considerar que el flujo sanguíneo y el consumo de  $O_2$  medidos (9 ml/100 g de tejido/min.; Daly et al., 1954) aseguraban una  $PO_2$  en la sangre venosa del CC, y por tanto en el tejido glómico, muy superior a la requerida para mantener el flujo de electrones en la cadena respiratoria normal incluso a  $PaO_2$  sistémicas muy inferiores al umbral de activación del CC (Lübbbers et al., 1977). La medición de niveles de ATP en el CC ha demostrado que niveles de hipoxia que producen activación intensa del CC no disminuyen los niveles de ATP o los reducen muy moderadamente (Obeso et al., 1985; Verna et al., 1990). Tampoco resultó cierto que el nexo común en la capacidad de los venenos metabólicos para activar al CC fuera la disminución del ATP: a concentraciones que producen activación comparable de las CQ (liberación de DA) y de la descarga en el NSC, el cianuro redujo en 45% los niveles de ATP, mientras que el dinitrofenol y el CCCP no los modificaron; la acción desacoplante de los dos últimos agentes se compensó con un aumento del consumo de glucosa (Obeso, 1984; Obeso et al., 1989a). A pesar de estos hechos, hay que mencionar que Mills y Jobsis (1970, 1972) encontraron que la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria del CC poseía una afinidad anómalamente baja por el  $O_2$ , lo que posibilitaría que aún a  $PO_2$  relativamente altas la cadena respiratoria se redujera y se produjera una disminución de la respiración y por tanto de la síntesis de ATP en las CQ. Utilizando células disociadas, Duchon y Biscoe (1992a, b) verificaron lo mismo con técnicas microfluorimétricas y en un estudio muy reciente Buckler y Turner (2013) lo confirman con idénticas técnicas. Por tanto, parece evidente que las CQ, en comparación con otras células (células sensoriales de los ganglios raquídeos o célula ganglionares simpáticas), poseen una cadena respiratoria especial, haciendo a priori plausible un papel de la mitocondria en la detección de  $O_2$  aun cuando la disminución de la  $PO_2$  sea muy moderada. Hay, sin embargo, dos hechos que son difíciles de aceptar: el primero, es que como muestra la Figura 6 (ver también más adelante) la respuesta de las CQ es un proceso de membrana plasmática mediado por canales iónicos y no se tiene idea cómo se acoplarían mitocondrias y membrana; el segundo, es que una inhibición de la cadena respiratoria, y por tanto disminución de la síntesis de ATP, como mecanismo de activación y señalización de unas células que tienen que funcionar al máximo precisamente cuando hay hipoxia, parece teleológicamente inadecuado, ¿cómo van a señalar las CQ y a defender al organismo frente a la hipoxia si son las primeras en quedarse sin ATP en situación de hipoxia?

La otra gran hipótesis clásica es la hipótesis ácida, propuesta inicialmente por Winder en 1937. Winder encontró que ciertas dosis de iodoacetato, un inhibidor de la glicólisis, abolían la respuesta a la hipoxia y no a los estímulos ácidos, postulando que las terminaciones sensoriales serían receptores de  $H^+$ , ya que el bloqueo de la producción de ácido láctico eliminaba la actividad del CC, mientras se conservaba la sensibilidad del órgano quimiorreceptor a los cambios directos de la  $[H^+]$ . La hipoxia estimularía a estos receptores porque al deprimir la oxidación de glucosa, activaría la glicólisis y producción de lactato. Los hallazgos de Winder no pudieron confirmarse, pero la idea de la unificación de los mecanismos de detección de los estímulos hipóxico y ácido fue retomada por Torrance quien entre 1974 y 1981 (Torrance, 1974; Hanson et al., 1981) propuso dos enmiendas distintas de la hipótesis ácida con unos postulados que no pudieron verificarse (ver Fidone y González, 1986). Sin embargo, en el contexto de la hipótesis ácida se encontró que la anhidrasa carbónica que media gran parte de la respuesta al alto  $CO_2$  se localiza en el interior de las células quimiorreceptoras (Rigual et al., 1985), implicando que la respuesta al ácido se generaría en las células, aunque no se pueda excluir cierta sensibilidad de las terminaciones sensoriales a los  $H^+$ .

En 1977, González y Fidone demostraron que la hipoxia aumenta la liberación de dopamina (DA) en CC aislados. Dado que esta catecolamina se encuentra almacenada casi con exclusividad en las CQ, el hallazgo implicaba que dichas células respondían a la hipoxia. En una serie amplia de estudios estos autores caracterizaron las enzimas involucrados en la síntesis, el propio proceso de síntesis y la liberación de CA en el CC de conejo, encontrando que la hipoxia inducía liberación de DA en relación directa con su intensidad (Figura 12A) y que la liberación inducida era dependiente de  $Ca^{2+}$  (Figura 12B). Idénticas observaciones se obtuvieron en el CC de gato, rata y ratón, demostrándose además que el alto  $K^+$  extracelular inducía liberación de DA de forma  $Ca^{2+}$  dependiente y que la liberación inducida por alto  $K^+$  y por hipoxia era sensible a dihidropiridinas antagonistas (y agonistas) de canales de  $Ca^{2+}$ , mientras que la liberación inducida por los estímulos ácidos, aún siendo dependientes de  $Ca^{2+}$ , era insensible a dihidropiridinas (para referencias ver Rocher et al., 2011).

En experimentos análogos, Rocher et al. (1988) demostraron que la veratridina, un activador de canales de  $Na^+$  voltaje dependientes, inducía liberación de DA de forma  $Na^+$  y  $Ca^{2+}$  dependiente y sensible a tetrodotoxina (TTX), y que la liberación inducida por la hipoxia es parcialmente sensible a TTX mientras que la inducida por estímulos ácidos no lo es (ver Rocher et al., 2011).

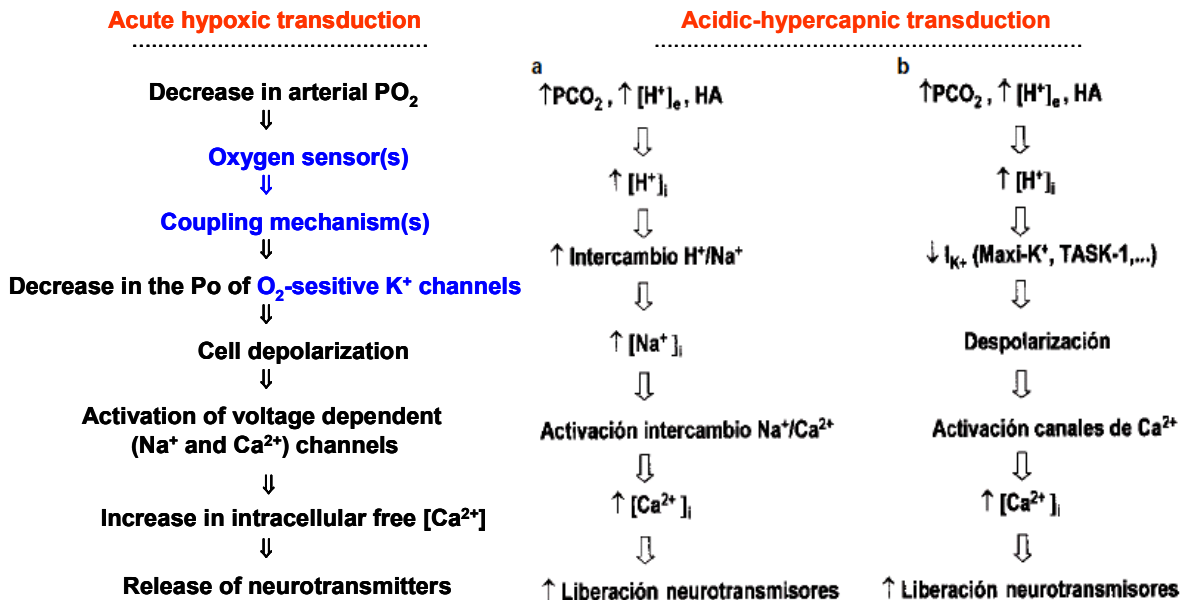
En su conjunto estas observaciones sugerían fuertemente que la hipoxia despolarizaba las CQ y promovía activación de canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje y liberación excitotóxica de neurotransmisores. En un intento de verificación directa de la despolarización se puso a punto un cultivo primario de CQ de conejo en la que se demostró la naturaleza excitable de las CQ y se descubrió el primer canal iónico regulable por la  $\text{PO}_2$ : la disminución de la  $\text{PO}_2$  produce una inhibición reversible de una corriente de  $\text{K}^+$  transitoria del tipo  $\text{I}_A$  (López-Barneo et al., 1988; López-López et al., 1989). La existencia de corrientes de  $\text{K}^+$  sensibles a la hipoxia en las CQ se extendió a todas las especies animales estudiadas incluyendo rata, gato, ratón. Estos hallazgos han constituido la base del modelo de membrana de transducción del estímulo hipóxico propuesto por González et al. (1992; 1994), que sigue teniendo plena vigencia aunque hay aspectos del mismo no satisfactoriamente resueltos (Figura 13). No se conoce 1) cómo las células detectan la  $\text{PO}_2$ , 2) cómo los posibles mecanismos de detección se acoplarían a los canales de  $\text{K}^+$ , 3) el significado real de los distintos canales de  $\text{K}^+$  sensibles a la  $\text{PO}_2$ .



**Figura 12. A.** Se muestra la relación lineal inversa entre el contenido de de  $\text{O}_2$  en el líquido de superfusión y la liberación de DA y descargas en el NSC; los datos se expresan como veces la respuesta obtenida en soluciones equilibradas con 100% de  $\text{O}_2$ . **B.** Se muestra un experimento en que se aplicaron cuatro estímulos, los dos centrales en ausencia de  $\text{Ca}^{2+}$  no evocaron respuesta secretora. Tomado de Fidone et al., 1982.

**3.4.1.1. Mecanismo de detección de la  $\text{PO}_2$ .** A lo largo de estos veinte años de la teoría o modelo de membrana de quimiorrecepción al oxígeno han surgido diversas propuestas de cómo tal proceso ocurriría y de qué estructura molecular sería la responsable. De forma general podemos decir que hay dos grandes grupos de

propuestas; en una de ellas la detección de la hipoxia sería un proceso o propiedad intrínseca de la membrana plasmática de las CQ requeriría compuestos solubles del citoplasma celular, en la otra el sensor de la  $PO_2$  sería algún enzima citoplásmico o mitocondrial cuyo producto o productos actuarían sobre los canales de  $K^+$  inhibiéndolos.

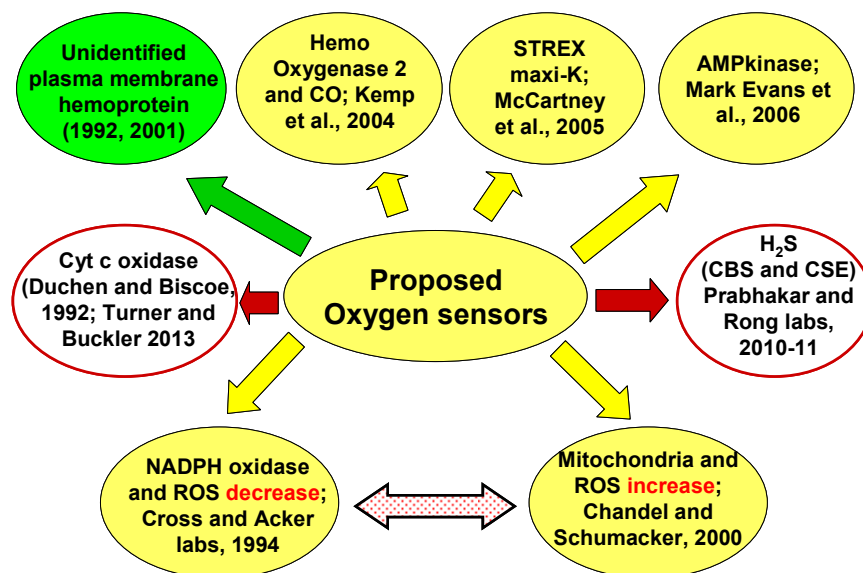


**Figura 13.** Modelo de membrana de transducción del estímulo hipóxico (izquierda) y del estímulo ácido-hipercápnico (derecha) según Rocher et al., 1991 (a) y según Buckler et al., 2000 (b). Tomados de Gonzalez et al. (2003). Algunos aspectos de las etapas destacadas en azul son desconocidos a nivel molecular.

**A. Candidatos a sensores de  $O_2$  en las células quimiorreceptoras.** La Figura 14 muestra los distintos sensores propuestos. La primera propuesta, que defiende el laboratorio de C. Gonzalez en Valladolid, se basa en unas observaciones experimentales y en una consideración teórica. Las observaciones experimentales consisten en que tanto en CQ de conejo como de rata, la hipoxia inhibe los canales de  $K^+$  en parches de membrana *inside out* y que en ambos casos el CO es capaz de sustituir al  $O_2$ . Ello implicaría que el sensor es una hemoproteína capaz de ligar  $O_2$  y CO, al igual que lo hace la hemoglobina y que la supuesta hemoproteína-sensor estaría en la membrana plasmática y no requeriría ningún factor soluble para interactuar con los canales de  $K^+$  (Gonzalez et al., 1994, 2009). Pero, ¿por qué no podrían ser los propios canales los sensores? La razón es que los canales que se inhiben por la hipoxia en parches aislados son distintos entre sí y no poseen, que se sepa, dominios de consenso para ligar el  $O_2$  y el CO (Gonzalez et al., 2009).

Recientemente Kemp y colaboradores (Williams et al., 2004) han encontrado que en normoxia la hemoxigenasa-2 genera CO que activa al maxi-K, un canal de  $K^+$  sensible

a la hipoxia en las CQ de rata. En hipoxia la actividad de este enzima, la hemoxigenasa-2, que utiliza como co-sustrato  $O_2$ , disminuye, por lo que al no generarse CO el maxi-K deja de estar activado, se inhibe. Esta inhibición más la producida por la propia hipoxia conduciría a la inhibición global del maxi-K que se observa en experimentos en célula entera. Sin embargo, esto no es compatible con la observación de que la disminución de la  $PO_2$  inhiba el maxi-K en parches aislados en configuración *inside out* porque la hemoxigenasa necesita el sustrato, el grupo hemo, y, además del  $O_2$ , necesita NADPH como co-sustrato. En los experimentos realizados en parches aislados por Riesco-Fagundo et al. (2001) no existe ninguno de estos co-sustratos por lo que la hemoxigenasa no podría funcionar. Obviamente esto no significa que en la célula intacta el mecanismo hemoxigenasa/maxi-K no pueda contribuir a generar la respuesta a la hipoxia.



**Figura 14.** Posibles sensores de la  $PO_2$  en las CQ del cuerpo carotídeo (tomada de Gonzalez et al., 2010).

De gran interés fue la observación hecha por McCarney et al. (2005) que, en un sistema heterólogo y en células tumorales, encontraron que una variante del maxi-K, el STREX, (que posee un dominio rico en cisteínas), era inhibido directamente por la hipoxia y por el CO. La propuesta era obvia: el STREX era el sensor. Sin embargo, Ross et al. (2011) encuentran que las CQ de rata, especie en la que el maxi-K es sensible a la hipoxia no expresan esta variante del canal.

El Prof. Mark Evans ha liderado la propuesta de que la quinasa dependiente de AMP (AMPK) sea el sensor. Este enzima, es capaz de fosforilar multitud de proteínas, entre ellas el maxi-K de las CQ. Al fosforilar el canal, éste se inhibe. La AMPK se activa cuando aumenta el AMP en las células, y, dada la baja concentración de este producto de degradación del ATP en condiciones normales, en relación a la concentración de ATP (AMP/ATP muy bajo), un ligero predominio de la degradación de ATP sobre la regeneración del mismo podría aumentar marcadamente la concentración de AMP y activar el enzima. Sin embargo, como en el caso de la hemooxigenasa, este modelo es incompatible con los hallazgos en parches aislados, sin negar la posibilidad de que en las células intactas juegue realmente un papel, no como sensor, sino como amplificador de la respuesta a la hipoxia.

El papel del sulfhídrico ( $H_2S$ ) como mediador de la respuesta a la hipoxia ha sido propuesto recientemente por dos laboratorios, con el problema a priori de que uno de ellos (Peng et al., 2010), basándose en experimentos con ratones knockout para cistationina- $\gamma$ -liasa (CSE) propone que este enzima es el generador del sulfhídrico importante para la génesis de la actividad quimiorreceptora. El otro laboratorio, también trabajando con ratón pero en este caso basándose en el uso de inhibidores de los enzimas parece demostrar que es la cistationine- $\beta$ -sintetasa (CBS) el enzima generador del sulfhídrico (Li et al., 2010). Ambos enzimas son citoplásmicos y la propuesta es que el sulfhídrico actuaría a nivel mitocondrial inhibiendo la citocromo oxidasa (Buckler y Turner, 2013). Datos de nuestro laboratorio indican que en efecto el sulfhídrico es capaz de modular la respuesta a la hipoxia y actualmente estamos tratando de definir cual de las dos fuentes de sulfhídrico es la importante (Gallego-Martín et al., 2012b). Hay que señalar que en los dos estudios de microarrays de ratón existentes, no se ha encontrado CSE de esta especie (pero si CBS), mientras que sí existe el enzima en CC humano (Mkrtchian et al., 2012).

El posible papel de la citocromo-c-oxidasa ya ha sido comentado. Respecto al papel de los ROS como señalizadores de la hipoxia hay una doble propuesta. De acuerdo con Acker y cols. (Cross et al., 1990) el sensor sería una NADPH oxidasa análoga a la de las células fagocitarias, que reduce el  $O_2$  molecular con un solo electrón para formar  $O_2^{\bullet-}$  que se dismuta a  $H_2O_2$ . La propuesta está basada en la observación de que un inhibidor de la NADPH oxidasa, el difenileneiodonio (DPI), activa las descargas del NSC y previene el efecto de la hipoxia. La propuesta era que la disminución de la  $PO_2$  inhibiría al enzima disminuyendo la producción de  $O_2^{\bullet-}$  y de  $H_2O_2$ ; esta disminución

de  $O_2^{\bullet-}$  y de  $H_2O_2$  cambiaría el potencial redox de la célula, esto es, el cociente glutatión reducido vs. glutatión oxidado (GSH/GSSG) hacia un valor más reducido, más alto, y ello generaría un cambio en la relación entre grupos sulfhidrilos libres y puentes disulfuro (Prot-SH/Prot-S-S) de los canales de  $K^+$  con la consiguiente modificación de su cinética de apertura. Otro grupo de autores (ver Chandel y Schumacker, 2000) encontraron que la hipoxia aumentaba la producción de ROS (de  $O_2^{\bullet-}$  y de  $H_2O_2$ ) a nivel mitocondrial y propusieron que el sensor sería la mitocondria y que la señal capaz de modificar la cinética de los canales de  $K^+$  sería el aumento de ROS, y no su disminución como proponía Acker. En estudios realizados en colaboración el laboratorio de Fidone en Salt Lake City y de González en Valladolid, usando knockouts para una de la subunidades de la NADPH oxidasa y técnicas de microfluorimetría, la evidencia que se obtuvo es que ninguna de las dos hipótesis parecía verosímil: en las células de los ratones *knockout* la hipoxia no activaba la producción de ROS mitocondriales ni podía inhibir la NADPH oxidasa porque no existía (He et al., 2005).

En suma, no sabemos en realidad como se detecta la hipoxia en las CQ. Parece evidente que de los múltiples mecanismos/reacciones dependientes de  $O_2$  que las células en general poseen, algunos de ellos tendrían propiedades cinéticas especiales en las CQ por lo que podrían modular la respuesta a la hipoxia, pero se desconoce cuál es el primer sensor que dispara la quimiorrecepción. En el modelo de la hemoproteína que ha propuesto el laboratorio de Valladolid el *handicap* para su aceptación es que no se ha conseguido identificar la hemoproteína candidata a sensor de  $O_2$ .

**B. Mecanismos de acoplamiento entre el sensor y los canales de  $K^+$  regulados o sensibles a la hipoxia.** El desconocimiento de la naturaleza del sensor de  $O_2$  hace difícil buscar el mecanismo de acoplamiento entre dicho sensor y los canales de  $K^+$  sensibles a  $O_2$ , que presumiblemente constituyen los primeros efectores de la detección-activación hipóxica. En los dos modelos en que se otorga un papel crítico a los ROS, el mecanismo de acoplamiento es sencillo de entender: cambio en la relación entre grupos sulfhidrilos libres y puentes disulfuro (Prot-SH/Prot-S-S) de los canales de  $K^+$  que promoverían los cambios cinéticos antes descritos. Sin embargo parece muy poco probable que este mecanismo tenga un significado fisiológico ya que el CO, que desde luego es incapaz de reducir u oxidar ninguna molécula en condiciones normales de temperatura y presión, revierte el efecto de la falta de  $O_2$  ( $PCO \approx 70$  a  $140$  mmHg y  $PO_2 \approx 30$  mmHg) tanto en CQ de conejo como de rata (Lopez-Lopez y González, 1992; Riesco-Fagundo et al., 2001).

De otro lado, se ha demostrado que la reducción de canales iónicos y la sensibilidad al  $O_2$  son cosas distintas. Así por ejemplo en células HEK transfectadas con canales de  $K^+$  de la familia *shaker*, *shaker*/ $\beta$ 1.2 y *Kv4.2*/ $\beta$ 1.2, el ditiotreitól disminuyó la corriente de los tres sistemas y la hipoxia sólo inhibió al último de ellos (Pérez-García et al., 1999). Además, Riesco-Fagundo et al. (2001) demostraron que el ditiotreitól aumenta la probabilidad de apertura del maxi-K y la hipoxia lo disminuye. Así pues, el estado redox de los canales no parece estar involucrado en el inicio de la cascada de transducción, lo que no excluye que pueda jugar un papel modulador de la misma. Si el sensor es una hemoproteína, el mecanismo de acoplamiento sería alostérico: la reorganización intramolecular del sensor, al desaturarse por la disminución del  $O_2$ , produciría cambios en la disposición espacial del mismo (tal como ocurre en la hemoglobina al desaturarse) que conducirían al cierre o que dificultarían la apertura de los canales de  $K^+$  sensibles a la  $PO_2$ . Si las mitocondrias (o alguno de sus componentes moleculares) fueran los sensores no sabemos qué señal producirían para modificar la cinética de los canales de  $K^+$ . Sin embargo, sea cual fuere el mecanismo, parece que las subunidades  $\beta$  reguladoras de los canales de  $K^+$  serían necesarias para el acoplamiento entre el mecanismo de detección o sensor(s) de  $O_2$  y la subunidad conductora de los canales de  $K^+$ . De hecho, en sistemas de transfección, las corrientes de  $K^+$  sólo son sensibles a la hipoxia si se cotransfectan las subunidades  $\alpha$  con subunidades  $\beta$  reguladoras o si la transfección se hace a tipos celulares que expresan dichas subunidades  $\beta$ . En otras palabras, las subunidades  $\beta$  interaccionarían con el presunto sensor hemoprotéico de  $O_2$  o serían los componentes de los canales de  $K^+$  que reaccionan con los ROS (o el glutatión) o con la señal originada en las mitocondrias (Pérez-García et al., 1999). Esta misma idea es apoyada por datos de Hartness et al. (2003), que encuentran que la hipoxia crónica, que se acompaña de sensibilización de las respuestas a la hipoxia, produce un aumento de expresión de subunidades  $\beta$  y de su co-localización con las subunidades  $\alpha$  de los canales de  $K^+$  sensibles a hipoxia.

**C. Canales de  $K^+$  sensibles a la hipoxia y su presumible función.** El primer canal de  $K^+$  sensible a la hipoxia fue descubierto en CQ de conejo (Lopez-Barneo et al., 1988). Se trata de una corriente voltaje dependiente que inactiva con propiedades cinéticas típicas de un rectificador tardío, cuyo umbral macroscópico de activación es próximo  $-40$  mV y que se inhibe de forma reversible al disminuir la  $PO_2$ . Ello ha hecho que se haya cuestionado su papel como disparador de la actividad de las CQ: si el canal no está activo en reposo, en normoxia, ya que el potencial de membrana ( $E_m$ ) es próximo a  $-55$  mV, difícilmente podrá inhibirse. Nuestro argumento en contra de dicha



afirmación ha sido doble: 1) a este  $E_m$  de -55 mV, la probabilidad de apertura es posible que sea baja, pero suficiente para que al ser inhibido despolarice las células; 2) las células poseen electrogénesis espontánea, haciendo posible que se reclute el canal de  $K^+$  y que pueda ser inhibido. De hecho, en CQ de conejo con dominantes negativos para canales de la familia *shaker* (Kv1) o *shal* (Kv4) obtenidas por transferencia adenoviral de los correspondientes genes mutados, se encontró que las células nulas para la familia Kv4 estaban despolarizadas en condiciones de normoxia y no se despolarizaban por la hipoxia, indicando que estos canales (y no los Kv1) contribuyen al mantenimiento del  $E_m$  y son responsables de la despolarización hipóxica (Pérez-García et al., 2000).

En la rata el primer canal de  $K^+$  sensible fue el maxi-K (Peers, 1990). La crítica era la misma, este canal que es dependiente de voltaje y de calcio no podía ser el disparador de la actividad de las CQ. Dos hallazgos parecen resolver esta problemática. El primer hallazgo se realizó en CQ de rata. En esta especie, varios autores habían encontrado que el TEA y la caribdotoxina o la iberiotoxina, todos ellos inhibidores del maxi-K, no modificaban en condiciones de normoxia ni el  $E_m$ , ni los niveles de  $Ca^{2+}$  de las CQ aisladas, ni la liberación de DA ni las descargas en el NSC en CC intactos; tampoco afectaban la liberación de DA ni la actividad en el NSC evocada por la hipoxia (ver Gómez-Niño et al., 2009 para referencias). Las conclusiones de estos estudios eran o que el maxi-K no era importante para señalar la hipoxia y/o que poseía una función que no conocemos. Sin embargo, Buckler (1997) hizo un hallazgo adicional: las CQ de rata poseen una corriente *leaky*, voltaje independiente que es inhibida por la hipoxia de forma reversible. Posteriormente identificó al canal que lleva dicha corriente como el TASK-1 (Buckler et al., 2000), aunque también podrían contribuir otros canales de la misma familia como el TASK-3 o heterocanales TASK-1/TASK-3 (Yamamoto et al., 2002; Kim et al., 2011a). Es importante señalar que la sensibilidad a la hipoxia de estos canales *leaky*, evidente en registros en *cell-attached*, se pierde al escindir los parches de membrana y pasar a registrar en configuración *inside-out*, indicando que su sensibilidad al  $O_2$  depende de algún factor citoplásmico soluble (ver Riesco-Fagundo et al., 2001). En suma, los hallazgos de Buckler parece que habrían resuelto el problema de la activación de las células al entrar en hipoxia. Por tanto, pensamos que el modelo de membrana se ajusta fenomenológicamente a las observaciones experimentales macroscópicas y es capaz de acomodar un número muy importante de las observaciones existentes a nivel celular y molecular, aunque los mecanismos íntimos sigan siendo desconocidos. De hecho, el mismo modelo de membrana ha sido adoptado para explicar la respuesta a la

hipoxia de las células musculares lisas de las arterias pulmonares y la vasoconstricción pulmonar hipóxica (ver Sylvester et al., 2012).

**3.4.1.2. Mecanismo de detección de los estímulos ácidos-hipercápnicos.** En la parte de la derecha de la Figura 13 se muestra la cascada de transducción del estímulo ácido, el otro gran estímulo del CC. En la parte (a) de la figura se muestra el modelo propuesto por Rocher et al. (1991) cuya evidencia fundamental para proponerlo fue que los bloqueantes-antagonistas de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes no inhibían la respuesta secretora de la CQ inducida por el ácido, mientras que los inhibidores del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  sí que lo hacían. En la parte (b) de la figura se propone un modelo que sería idéntico al de la detección de la hipoxia pero basado en la sensibilidad intrínseca de los canales de  $\text{K}^+$  (Buckler et al., 2000).

### **3.4.2. Comunicación entre las CQ y las terminaciones nerviosas. Neurotransmisión en el CC.**

Al igual que ocurre con los mecanismos de transducción, los mecanismos y/o neurotransmisores responsables de la comunicación entre las CQ y las terminaciones sensoriales del NSC tampoco son conocidos. La idea de neurotransmisión entre las CQ y las terminaciones nerviosas del NSC fue avanzada por De Castro al definir el CC como un órgano sensorial. El único neurotransmisor considerado hasta finales de 1950 fue la ACh. Fueron muchos los autores que demostraron que la ACh y agentes anticolinesterásicos eran excitatorios para la actividad en el NSC. Eyzaguirre y colaboradores en una serie de artículos compilados en Eyzaguirre y Zapata en varias revisiones (ver p.e. Eyzaguirre y Zapata 1968) proporcionaron un fuerte empuje a la llamada teoría colinérgica, al demostrar entre otras cosas que el CC de gato contenía ACh y que ésta se liberaba en respuesta a la estimulación hipóxica. Sin embargo los estudios farmacológicos no consiguieron demostrar que la inhibición de la transmisión colinérgica con bloqueantes nicotínicos y muscarínicos suprimiera la actividad quimiorreceptora generada por los estímulos naturales. Además, en estudios recientes, Gauda et al. (2004) han demostrado que las CQ de rata no expresan colinacetiltransferasa, que se localiza exclusivamente en células ganglionares intraglómicas: la ACh no puede ser el neurotransmisor entre las CQ y terminaciones sensoriales, no se encuentra en el elemento pre-sináptico. Esto sugiere que la expresión de ACh en co-cultivos (Nurse, 2010) y los hallazgos en esta preparación tal vez sean modificaciones fenotípicas. Por tanto la ACh como neurotransmisor primario no parece aceptable.

Según se ha mencionado, en el año 1957 Lever y Boyd demostraban la presencia en las CQ de vesículas de núcleo denso comparables a los de las células cromafines de la médula adrenal, y proponían que tal vez se debiera a que las CA fueran los neurotransmisores. A este artículo pionero siguieron multitud de estudios que caracterizaron los enzimas involucrados en la síntesis de CA, el proceso de síntesis de CA en normoxia e hipoxia y la liberación de CA en respuesta a la hipoxia (ver González et al., 1994). La problemática con las CA como posibles neurotransmisores en la unión célula glómica-terminaciones sensoriales del NSC es que las CA exógenas no siempre mimetizan los efectos de los estímulos naturales: en vez de estimular como la hipoxia, con frecuencia inhiben las descargas en el NSC o la ventilación y los bloqueantes catecolaminérgicos en vez de inhibir la actividad quimiorreceptora con frecuencia la aumentan.

Además de la presencia de serotonina en el CC, demostrada por Chiochio et al. (1967), y cuyo significado funcional es dudoso, existe evidencia bioquímica e inmunocitoquímica de la existencia de un número importante de neuropéptidos. Aunque existen observaciones experimentales respecto a acciones concretas de uno u otro péptido, el significado funcional general de los neuropéptidos en el CC, ya sea como moduladores de la función de las células glómicas o de la transmisión sináptica o como factores tróficos a largo plazo, no está bien definida. Cabe destacar a la sustancia P por la gran atención que ha recibido. La ausencia de RNAm que codifique para este neuropéptido en las CQ le excluye como neurotransmisor primario, pero muy bien pudiera ser que la liberación de sustancia P de las terminaciones sensoriales, donde es muy abundante, fuera capaz de modular la actividad quimiorreceptora (Gauda, 2002). Los péptidos opioides, presentes en las CQ, son inhibitorios tanto de la actividad en el NSC como de la ventilación (ver González et al., 1994), y al menos parte de sus acciones las ejercen vía receptores pre-sinápticos ya que son capaces de inhibir la respuesta secretora de las CQ frente gran variedad de estímulos.

Recientemente Nurse y cols. han desarrollado una preparación de co-cultivo de CQ y de neuronas del ganglio petroso que forman sinapsis funcionales. Ello hace que si se registra en las neuronas tras formar las sinapsis, y no antes, es posible observar actividad espontánea y un aumento de descargas en respuesta a la hipoxia que es bloqueado por una mezcla de bloqueantes nicotínicos (mecamilamina) y purinérgicos (suramina). La conclusión es obvia en la sinapsis célula quimiorreceptora-terminación sensorial, al menos en el medio artificial que supone el cultivo, la neurotransmisión es

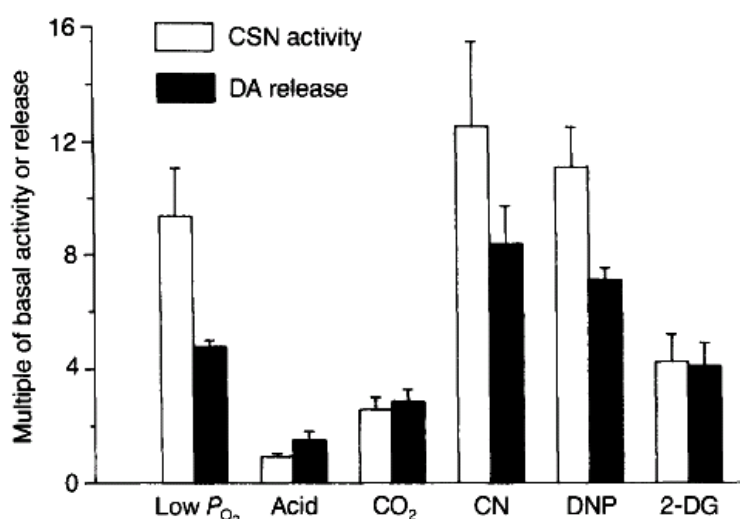
una co-transmisión colinérgica y purinérgica (Zhang et al., 2000; Nurse, 2010). Los receptores purinérgicos responsables de la cotransmisión en el CC serían receptores P2X2 y P2X3 (ya sea como homo o como hetero-receptores), cuya expresión se solapa muy frecuentemente en las mismas neuronas del ganglio petroso y en las terminaciones nerviosas del NSC a nivel intraglómico (Prasad et al., 2001).

Ya se ha mencionado que las CQ no expresan colinacetiltransferasa *in vivo*, por lo que el rasgo colinérgico sería una adquisición del medio de cultivo. El papel del ATP como transmisor primario ha recibido un fuerte apoyo en estudios de Rong et al. (2003) y de Spyer et al. (2004); estos autores encuentran que ratones *knockout* para receptores purinérgicos del tipo P2X2 son incapaces de responder a la hipoxia, mientras que responden a la hipercapnia (la respuesta es mediada en más de un 50% por los quimiorreceptores centrales); además, registros *in vitro* de la actividad en el NSC demuestran que los CC son incapaces de generar actividad eléctrica frente a la hipoxia en las fibras del NSC. La conclusión sería que el ATP es el neurotransmisor principal en esta sinapsis sensorial y que el resto de neurotransmisores son co-transmisores secundarios con capacidad para modular la actividad tanto a nivel pre-sináptico como post-sináptico. Experimentos recientes de He et al. (2006) realizados en rata dan al ATP una responsabilidad de en torno al 50% de la actividad registrada en el NSC en respuesta a la hipoxia. En este sentido nuestro laboratorio ha encontrado que en la rata la adenosina sería el responsable del otro 50% de la actividad, ya que inhibidores no específicos de receptores de adenosina, como la cafeína, disminuyen en ese porcentaje la actividad eléctrica generada por la hipoxia. Una disección farmacológica del efecto de la cafeína indica que ésta actúa en receptores del subtipo A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub>; poniendo las cosas en forma directa diríamos que la adenosina liberada endógenamente es responsable del 50% de la actividad generada por la hipoxia (Conde et al., 2006). Finalmente, en un estudio muy reciente de nuestro laboratorio (Conde et al., 2012a) se demuestra que la importancia de cada neurotransmisor depende de la intensidad del estímulo: en hipoxias moderadas la adenosina es el principal responsable del acoplamiento entre células quimiorreceptoras-terminaciones nerviosas ya que los bloqueantes de receptores A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> eliminan  $\geq 70\%$  de la actividad mientras que en hipoxia intensas son muy poco efectivos, eliminando no más de un 20%. Por el contrario, la suramina, bloqueante de los receptores de ATP, inhibe  $\approx 80\%$  de la actividad en hipoxia intensa. La combinación de ambos tipos de bloqueantes eliminó  $>90\%$  de todas las respuestas hipóxicas.

Tras esta visión sucinta vamos a referirnos a un aspecto de la neurotransmisión que consideramos de gran interés. La liberación de DA y NE ha sido sugerida por múltiples estudios *in vivo*, al demostrar una disminución de DA y/o NE en el CC asociada a un aumento del *turnover* de las mismas tras un episodio agudo de hipoxia. Sin embargo, han sido los laboratorios de Fidone y el nuestro propio los que han caracterizado más en detalle, la liberación de CA en relación con multitud de estímulos, utilizando métodos radioisotópicos y voltamétricos. La primera medida directa de liberación de CA por la hipoxia fue obtenida en CC de conejo por González y Fidone (1977) y en una serie de estudios posteriores se cuantificó la relación entre la intensidad de la hipoxia, la actividad en el NSC y la cantidad de CA liberada en la misma especie, demostrando, además, que la CA liberada era DA. Los estudios se hicieron extensivos a otras especies tales como el gato, la rata, la ternera y el ratón, tanto en nuestro como en otros laboratorios. Ha habido otros laboratorios que han comprobado igualmente la liberación en rata, en conejo y en gato. La liberación de DA frente a los estímulos ácidos ha sido caracterizada por nosotros también, y determinamos la relación entre intensidad de estímulo, actividad en el NSC y la cantidad de CA liberada. Para estímulos farmacológicos también hemos establecido esa relación entre concentración del agente estimulante, liberación de DA y aumento de actividad en el NSC tanto en gato como en conejo (ver González et al., 1992). También hicimos la primera demostración cuantitativa de liberación de DA en células en cultivo, y posteriormente el grupo de Lopez-Barneo y de Peers lo verificaron en célula única con técnicas voltamétricas y amperométricas y en células identificadas en una preparación de cortes de CC.

La liberación de CA en el CC intacto o CQ aisladas trasciende a la neurotransmisión *sensu stricto*, ya que es un parámetro que se utiliza como índice de la activación de las CQ: no existe en nuestro conocimiento ningún estímulo para el CC que no aumente la liberación de CA y además existe una correlación razonable entre intensidad de estimulación y aumento de liberación de DA y de frecuencia de potenciales de acción en el NSC frente a múltiples estímulos (Figura 15). Sin embargo, existen dos estudios de Donnelly (1995, 1996) en los que muestra que frente a estimulación repetida o en animales reserpinizados tal paralelismo se rompe: la liberación de DA disminuye con cada nuevo estímulo pero la frecuencia de descargas en el NSC se mantiene constante. Sin embargo, éste es el patrón normal de conducta de los sistemas catecolaminérgicos a la estimulación repetida y a la reserpinización (González et al., 1994). Iturriaga et al. (1996), aún cuando observan el paralelismo antes mencionado, obtienen una disociación temporal entre liberación de DA y actividad en el NSC, en el

sentido que la última precedería a la primera, pero con técnicas idénticas Buerk et al. (1995) llegaron a la conclusión opuesta. Además la experiencia de este laboratorio demuestra que el establecimiento de la relación temporal con técnicas voltamétricas entre liberación de CA y descargas es imposible de hacer con fiabilidad: depende de dónde se implante el electrodo de fibra de carbono en el CC, y dónde tenga su origen la unidad quimiorreceptora del NSC que se está registrando. Ambas localizaciones son incontrolables experimentalmente (Rigual et al., 2002; Prieto-Lloret et al., 2007).



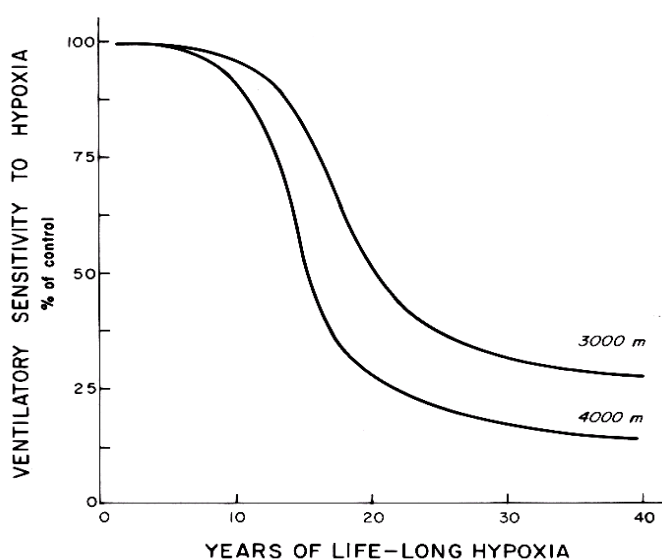
**Figura 15.** Relación entre la liberación de DA y la actividad eléctrica en el NSC evocadas por distintos estímulos. La Figura muestra sólo una intensidad de estimulación para cada estímulo, pero en los estudios originales se realizaron curvas con distintas intensidades de estimulación en todos los casos (tomada de González et al., 1992).

### 3.5. El caso especial del cobaya.

La relación entre  $PO_2$  y descargas se ha establecido fundamentalmente en base a datos obtenidos en gato y la relación entre  $PO_2$  y ventilación se ha establecido en base a datos obtenidos en varios mamíferos, incluido el hombre. Los datos de la tabla de la Figura 9 corresponden al hombre. Si la hipoxia se mantiene durante horas-días-semanas se asiste a una sensibilización del reflejo quimiorreceptor que se traduce en una ventilación exagerada para el nivel de hipoxia bajo estudio. Esta sensibilización tiene su origen y es mediada en su totalidad por el CC (Bisgard, 2000).

Sin embargo, en humanos que nacen y viven en un ambiente hipóxico (e.g., a grandes alturas) presentan una respuesta a la hipoxia menor de la que corresponde al

nivel de hipoxia bajo estudio (Lahiri, 1977; Bisgard y Neubauer, 1995), presentan una desensibilización del reflejo quimiorreceptor. Es importante observar (ver Figura 16) el curso temporal de la desensibilización del reflejo quimiorreceptor. Los niños ventilan normalmente en respuesta a la hipoxia hasta los 8-10 años de vida y luego pierden la capacidad de responder a la hipoxia, de tal forma que, si han nacido y vivido entre 3000 y 4000 m sobre el nivel del mar, en la tercera década de vida presentan aproximadamente un 20-25% de la hiperventilación que se observa en un sujeto nacido a nivel del mar y que asciende de forma aguda a esa altura. Este efecto, esta desensibilización no afecta a todas las especies, ya que las llamas, cabras montesas y ovejas nacidas y criadas a grandes alturas ventilan normalmente en respuesta a la hipoxia (ver Lahiri, 1977 para referencias). Otro aspecto importante de esta disminución de la respuesta ventilatoria a la hipoxia en nativos de grandes es su aparente reversibilidad. Según Lahiri (1977) esta reversibilidad requiere varios años ya que en una serie de 59 sujetos examinados por este autor que habían emigrado desde las grandes alturas a la costa, aquellos que llevaban 10 años o más viviendo a nivel de mar presentaban una respuesta normal mientras que aquellos que habían emigrado en tiempos recientes a la costa mostraban una respuesta ventilatoria a la hipoxia atenuada. La pérdida de la capacidad de responder a la hipoxia no parece ser de origen genético ni epigenético en humanos ya que hijos de padres habitantes de grandes alturas que nacen y crecen a nivel del mar no desarrollan esta desensibilización (Lahiri, 1977); serían, pues, factores ambientales (la hipoxia sostenida) los responsables de la pérdida de la capacidad de responder a la hipoxia de forma adecuada.



**Figura 16.** Ventilación hipóxica y su dependencia de la edad en nativos a grandes alturas (tomada de Lahiri, 1977).

Sin embargo, parece claro según se desprende de estudios más recientes que hay factores genéticos o epigenéticos involucrados en las peculiaridades de la respuesta a la hipoxia en humanos que viven a grandes alturas (Frisancho et al., 2009). Por ejemplo, los habitantes de grandes alturas en las planicies andinas muestran una respuesta ventilatoria a la hipoxia deprimida, pero habitantes tibetanos a las mismas alturas que los andinos muestran una respuesta ventilatoria a la hipoxia normal (Zhuang et al., 1993). De igual modo el estudio reciente de Brutsaert et al. (2004) en el que se utiliza un amplio abanico de 80 marcadores genéticos indica que hay factores genéticos implicados en las peculiaridades ventilatorias encontradas en los descendientes de quechuas nacidos y crecidos a nivel del mar cuando se les compara con descendientes de españoles nacidos y crecidos en el mismo ambiente (ver Bigham et al., 2013), entre estas peculiaridades cabe destacar la hipoventilación a hipoxias sostenidas durante 10 min. En este sentido, hay que destacar que las adaptaciones a las grandes alturas entre residentes de grandes alturas no es siempre la misma. Por ejemplo, los tibetanos han desarrollado una capacidad ventilatoria mayor que los residentes a nivel del mar con una policitemia mínima, mientras que los andinos han desarrollado una policitemia importante que constituye un factor de riesgo de padecer accidentes cardiovasculares agudos y de mortalidad perinatal (Prabhakar y Semenza, 2012).

Estas observaciones hechas en humanos nos conducen al objeto de nuestro proyecto: el estudio de la sensibilidad y respuesta ventilatoria a la hipoxia en el cobaya. Los estudios sobre la ventilación hipóxica en el cobaya son escasos, pero en la generalidad de ellos, se encuentra que los quimiorreceptores del CC no responden a la hipoxia y sí lo hacen al CO<sub>2</sub>. Por ejemplo, Blake y Banchemo (1985) encuentran que la hipoxia aguda no produce aumento de ventilación y sólo un aumento muy moderado (36% a una presión barométrica de 430 mmHg, equivalente a una altura sobre el nivel de mar de 4600 m a una atmósfera que contenga 11% de O<sub>2</sub> a nivel del mar) en situaciones de hipoxia crónica (11 a 15 semanas). En la Tabla IA se presenta un resumen de los datos de las respuestas ventilatorias obtenidas en cobaya por distintos laboratorios, tanto en respuesta a la hipoxia como a la hipercapnia. La generalidad de los autores encuentran que mientras que los cobayas no hiperventilan, o lo hacen mínimamente en comparación con la rata, muestran una hiperventilación a la hipercapnia comparable a la que se observa en rata. Se incluyen también en la tabla el mismo tipo de datos obtenidos en rata, con el objeto de poner de manifiesto que, mientras que el aumento de la ventilación a la hipercapnia es comparable en las dos especies animales, la ventilación a la hipoxia es evidente en rata y está esencialmente ausente en el cobaya. Es más, en



el estudio de Schwenke y Cragg del año 2000, la denervación del CC en el cobaya no eliminó el modesto aumento de ventilación a la hipoxia encontrado en animales controles, sugiriendo que ese pequeño aumento de ventilación se origina fuera del CC, tal vez a nivel de los cuerpos aórticos. Por el contrario en un estudio del laboratorio del Prof. Patricio Zapata (Fernández et al., 2003) se obtienen resultados distintos. Estos autores chilenos utilizaron el test de Dejours para definir el papel de los quimiorreceptores del CC en el control ventilatorio. Si observamos la Figura 9 se comprueba que cuando el animal respira una mezcla rica en  $O_2$  u  $O_2$  puro de tal forma que la  $PaO_2$  es muy alta las descargas disminuyen marcadamente, y de hecho lo hacen de forma brusca. Pues bien, al igual que ocurre con la actividad eléctrica, hay una depresión ventilatoria de hasta el 20-40% cuando se pasa de forma brusca de respirar una mezcla hipóxica a una mezcla rica en  $O_2$ . La depresión ventilatoria puede ser más marcada si el animal esta respirando una mezcla hipóxica y se pasa a respirar  $O_2$ . Este efecto que se observa tanto en animales como en humanos y despiertos o anestesiados se conoce con el nombre de test Dejours que fue quien lo describió y definiría lo que el CC está contribuyendo en cada caso al mantenimiento de la ventilación/minuto. Pues bien como muestra la Tabla IB los autores chilenos encontraron que el reflejo quimiorreceptor en el cobaya contribuía al mantenimiento de la ventilación igual o más que en la rata.

Volviendo a la Tabla IA, podríamos resumirla diciendo que los cobayas en respuesta a una hipoxia del 10% de  $O_2$  no hiperventilan en absoluto, existiendo de hecho una tendencia a una disminución de la ventilación, mientras que en la rata la misma hipoxia genera una hiperventilación que representa una duplicación de la ventilación en la atmósfera normal del 21% de  $O_2$ . En respuesta al 8% de  $O_2$  el aumento de ventilación en el cobaya representa un 14 al 32% sobre la ventilación en la atmósfera normal del 21%, y parece que esa ligera respuesta ventilatoria es generada fuera del CC ya que no se modifica por la denervación del órgano; la misma hipoxia en la rata genera una respuesta ventilatoria del 268%.

Frente a esta dualidad manifiesta de la ventilación entre rata y cobaya en respuesta a la hipoxia, la respuesta a la hipercapnia es comparable en ambas especies, lo que indicaría que la integración de los *inputs* en los controladores troncoencefálicos de la ventilación es adecuada o comparable en ambas especies y que lo que ocurre en respuesta a la hipoxia es que en el cobaya el CC no genera un *input* adecuado a dichos controladores troncoencefálicos, esto es, que el CC no responde a la hipoxia.

Consistente con estas ideas de una integración normal a nivel de los centros respiratorios troncoencefálicos, en el estudio antes mencionado de Blake y Blanchero (1985) se observa que la exposición al frío genera una importante hiperventilación equivalente a 2.4 veces la que poseen los animales en el ambiente eutérmico del laboratorio. Esto les lleva a concluir que los *inputs* desde los centros termorreguladores hipotalámicos a los centros de integración ventilatoria del tronco del encéfalo son procesados adecuadamente de tal forma que el aumento de ventilación satisface exactamente el aumento de consumo de O<sub>2</sub> necesario para mantener una temperatura corporal adecuada. Obviamente los datos de Tabla IB no dicen eso, y de hecho Fernández et al. (2003), concluyen que sus hallazgos no coinciden con los Cragg y Schwenke de 1996.

**Tabla I. A.** Respuesta ventilatoria a la hipoxia y a la hipercapnia en cobaya. **B.** Test de Dejours en gato rata y cobaya.

**A**

ESPECIE ANIMAL	VM Normoxia (ml/min/100g)	VM Hipoxia (ml/min/100g)	VM Hipoxia/ VM normoxia	VM Hipercapnia (ml/min/100g)	VM Hipercap/ VM normoxia	Autores
COBAYA	30	28 (12% O <sub>2</sub> )	0.9	---	---	Blake y Blanchero (1985)
COBAYA	30	41 (6% O <sub>2</sub> )	1.4	116 (8% CO <sub>2</sub> )	3.8	Cragg y Schwenke (1996)
COBAYA	40 CSN Den: 29	53 CSN Den: 37 8% O <sub>2</sub>	1.3 CSN Den: 1.3	153 CSN Den: 80 8% CO <sub>2</sub>	3.8 CSN Den: 2.8	Schwenke y Cragg (2000, 2004)
COBAYA	41	47 (8% O <sub>2</sub> ) 37 (10% O <sub>2</sub> )	1.14 0.9	----	----	Yilmaz et al. (2005)
COBAYA (10-14DÍAS)	111	103.8 (10% O <sub>2</sub> )	0.93	180 (3% CO <sub>2</sub> ) 465 (6% CO <sub>2</sub> ) 483 (9% CO <sub>2</sub> )	1.6 4.2 4.4	Curran et al. (1995)
RATA	59	159 (8% O <sub>2</sub> )	2.7	126 (5% CO <sub>2</sub> ) 241 (12% CO <sub>2</sub> )	2.1 4.1	Wu et al. (2005)
RATA	52	103 (10% O <sub>2</sub> )	2.0	----	----	Reeves et al. (2003)
RATA	63	114 (10% O <sub>2</sub> ) 129 (7% O <sub>2</sub> )	1.8 2.1	127 (5% CO <sub>2</sub> )	2.0	Nuestro laboratorio

**B**

	TV (ml)		Bf (min <sup>-1</sup> )		VM (ml/min)		% Inhibicion
GATO	29 (20% O <sub>2</sub> )	21 (100% O <sub>2</sub> )	17 (20% O <sub>2</sub> )	15 (100% O <sub>2</sub> )	521 (20% O <sub>2</sub> )	322 (100 O <sub>2</sub> )	38
RATA	2.3 (20% O <sub>2</sub> )	2.3 (100% O <sub>2</sub> )	100 (20% O <sub>2</sub> )	86 (100% O <sub>2</sub> )	229 (20% O <sub>2</sub> )	197 (100% O <sub>2</sub> )	15
COBAYA	3.8 (20% O <sub>2</sub> )	2.9 (100% O <sub>2</sub> )	60 (20% O <sub>2</sub> )	54 (100% O <sub>2</sub> )	230 (20% O <sub>2</sub> )	156 (100% O <sub>2</sub> )	32

Otros aspectos de la organización estructural y funcional del CC han sido muy poco estudiados. Hay en la literatura unos pocos artículos en los que se han estudiado aspectos puntuales de la morfología del CC tanto a nivel ultraestructural como inmunocitoquímico (p. e., Kondo, 1971; Kummer, 1988, 1990; Heym y Kummer 1989; ver Ichikawa, 2002 para revisión). De estos trabajos no es posible extraer ninguna pista que asocie peculiaridades morfológicas o inmunocitoquímicas con la incapacidad de CC del cobaya para responder a la hipoxia, ya que entre las distintas especies existen ligeras diferencias respecto de la intensidad de marcaje inmunocitoquímico para uno u otro neuropéptido y sólo el cobaya sería incapaz de generar respuestas a la hipoxia.

Existe un único trabajo en el que se ha estudiado a nivel neuroquímico el CC de cobaya (Mir et al., 1982). En este estudio se midió el contenido de CA en el CC de distintas especies expresando los contenidos por órgano (pmole/CB) y los niveles en el cobaya son intermedios entre la rata y el conejo, en correspondencia razonable con el distinto tamaño corporal.

En suma, con la literatura existente habríamos de concluir que el CC de cobaya parece no responder a la hipoxia y que no existen, o no han sido puestas de manifiesto, peculiaridades morfológicas, inmunocitoquímicas o neuroquímicas que justifiquen esta incapacidad del principal órgano quimiorreceptor de los mamíferos para responder a este estímulo. De otro lado, la normalidad de la respuesta ventilatoria a la hipercapnia sería indicativa de una respuesta normal del CC a este estímulo. Pensamos que el cobaya, originario de los Andes, es un mamífero genóticamente adaptado a las grandes alturas, lo que incluye, entre otras cosas, que aún a nivel del mar y de forma permanente, exhiban una respuesta ventilatoria a la hipoxia enormemente atenuada (como ocurre en humanos adultos nacidos y residentes a grandes alturas) y una afinidad exagerada de su hemoglobina por el O<sub>2</sub> con una P<sub>50</sub> 10-12 mmHg inferior a la de los animales de su tamaño (Pairet y Jaenicke, 2010). En este sentido, la alta afinidad de la hemoglobina por el oxígeno remeda a la que posee la hemoglobina fetal en comparación con la hemoglobina del adulto en humanos.



## **OBJETIVOS Y SU JUSTIFICACIÓN**



Este trabajo que presento como Tesis Doctoral posee dos objetivos generales íntimamente ligados entre sí: el primero es resolver la controversia presente en la literatura sobre si los cobayas, al igual que hacen el resto de los mamíferos, poseen o no capacidad para responder a la hipoxia aguda con una respuesta ventilatoria. Si la respuesta fuera negativa, el segundo objetivo general sería definir que etapa o etapas de la cascada de transducción hipóxica está afectada para conducir al déficit funcional global del cuerpo carotídeo. Basándonos en la información presentada en la Introducción, estos dos objetivos generales podríamos desglosarlos en los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar posibles diferencias en la morfología y morfometría básicas entre el cuerpo carotídeo de cobaya y de rata.

2. Verificar si el cobaya hiperventila o no en respuesta a los estímulos hipóxico e hipercápnico agudos, estudiando el proceso de aclimatación a la hipoxia crónica.

3. Caracterizar el metabolismo de las catecolaminas en el cuerpo carotídeo de cobaya, en particular la liberación en respuesta a la hipoxia y otros estímulos clásicos del cuerpo carotídeo, verificando si existe el paralelismo establecido en otras especies entre la ventilación y liberación de catecolaminas por las células quimiorreceptoras.

4. Cuantificar las modificaciones de los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelular inducidas por la hipoxia en las células quimiorreceptoras de cobaya aisladas.

Este objetivo intenta explorar la posibilidad de que aún cuando no existiera un paralelismo entre la liberación de catecolaminas y ventilación, tal vez pudiera deberse a que fuera algún otro neurotransmisor el que acoplara las células quimiorreceptoras a las terminaciones sensoriales del nervio del seno. En tal caso, la hipoxia debería promover un aumento de  $Ca^{2+}$  en las células quimiorreceptores que habría de poner en marcha la liberación regulada del neurotransmisor alternativo.

5. Verificar la presencia o ausencia de corrientes de  $K^+$  sensibles a la hipoxia en las células quimiorreceptoras del cobaya.

La presencia de canales de  $K^+$  sensibles a la hipoxia y su inhibición por la disminución de la  $PO_2$  constituyen el primer efector-efecto de la respuesta de las células quimiorreceptoras a la hipoxia. La pregunta es, ¿poseen las células quimiorreceptoras del cuerpo carotídeo de cobaya este primer elemento efector de la cascada de transducción del estímulo hipóxico?

6. Valorar los efectos de la hipoxia sobre la presión arterial, glucemia, lactacidemia y niveles de catecolaminas plasmáticas y la posible sensibilidad directa de las células cromafines de la médula adrenal a la hipoxia.

En los animales recién nacidos, que carecen de actividad quimiorreceptora, la médula adrenal se activa intensamente en respuesta a la hipoxia, dando como resultado un aumento muy marcado en plasma y en todo el medio interno de epinefrina y norepinefrina, que luchan contra la hipoxia activando distintas rutas metabólicas. Además, esta respuesta de la médula adrenal se debe a que las células cromafines de la médula adrenal son directamente sensibles a la hipoxia. Supuesto que el cobaya adulto no hiperventilara en respuesta a la hipoxia, ¿conservarían sus células cromafines la sensibilidad a la hipoxia que muestran los animales neonatos? Esas consideraciones son las que han motivado el objetivo número seis.

Desde un punto de vista práctico, hemos decidido duplicar en rata los experimentos que tenemos que realizar en cobaya para cumplir los objetivos del trabajo. Dado que en líneas generales los datos en rata son conocidos, este diseño experimental nos permite validar los hallazgos obtenidos en el cobaya asegurándonos un correcto proceder experimental.

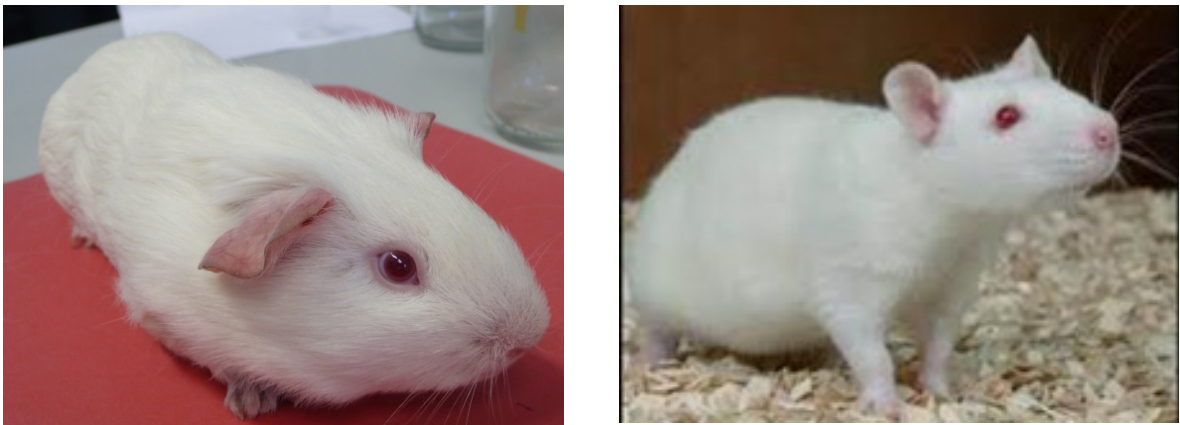


## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Animales.

Los experimentos de este trabajo se han realizado en cobayas y ratas jóvenes machos en ambos casos. Los cobayas de la cepa Hartley se compraron a Harlam Ibérica cuando tenían siete semanas de edad y se les mantuvo en jaulas de cobaya (tres por caja), en el animalario de la Universidad de Valladolid en la Facultad de Medicina hasta los cinco meses, momento en que alcanzaban los 800-900g de peso. Las ratas de la cepa Wistar se crían en nuestro animalario y se las utilizó para los experimentos cuando tenían 3-4 meses de edad y un peso que oscilaba entre 250-350g (Figura 1MyM). La temperatura del animalario se mantuvo entre 20-23°C con ciclos de luz-oscuridad estacionales. Además de por la apariencia de los animales, el buen estado de los mismos es muy evidenciable en los cobayas, animales que son extremadamente sociales y poseen una conducta de juego muy intensa. A los animales se les alimentó con dieta estándar propia para cada especie y agua *ad libitum* y a los cobayas se les suplementó el agua de bebida con vitamina C (1g/l; Farma Bayer S.A., España), ya que estos animales no poseen capacidad de sintetizarla y entran en avitaminosis en unos pocos días.



**Figura 1MyM.** Animales utilizados en esta Tesis Doctoral. Cobaya Hartley y rata Wistar.

## 2. Pletismografía.

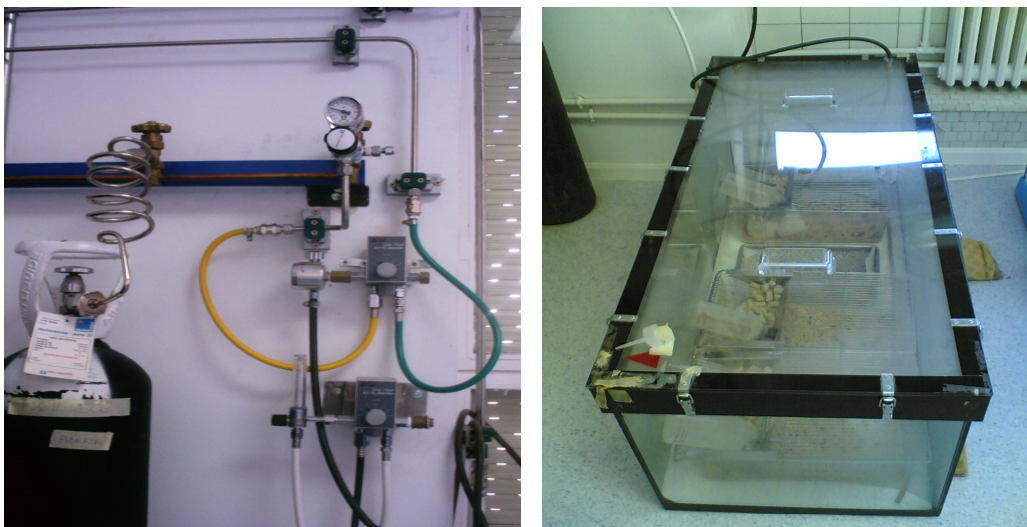
En los cobayas se realizó una pletismografía a la semana de su llegada al laboratorio (2 meses) y luego se repitió mensualmente, a los 3, 4 y 5 meses de edad para definir posibles modificaciones en el patrón respiratorio dependientes de la edad. La pletismografía se realizó con el animal despierto y en libre movimiento en un equipo de pletismografía de EMKA Technologies (Paris, Francia). El sistema consta de 4 cámaras

de metacrilato de 5 litros de capacidad a las que se aprovisiona con un flujo de aire continuo de 2 l/min. para cada cámara conseguido a través de un caudalímetro (Key Instruments) alimentado desde balas o tanques de gases comprimidos. El equipo nos permite registrar los parámetros ventilatorios en cuatro animales simultáneamente. El animal es colocado en la cámara del pletismógrafo respirando aire ambiente durante al menos 30 min. para que el animal explore la jaula y tras reconocer el nuevo habitat adquiera una conducta de reposo. Conseguida la conducta de reposo, se inicia el registro para su análisis *off line* variando la composición del gas con que se ventilan las cámaras pletismográficas que contienen al cobaya. Así se exploran respuestas ventilatorias en normoxia mientras se inyecta en la cámara pletismográfica aire (21% O<sub>2</sub> + 99% N<sub>2</sub>), las respuestas ventilatorias a la hipoxia aguda mientras se ventila la cámara con una mezcla hipóxica (10% O<sub>2</sub> + 90% N<sub>2</sub>) y las respuestas ventilatorias a la hipercapnia mientras se ventila con una mezcla conteniendo 5% CO<sub>2</sub> (21% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> + 74% N<sub>2</sub>). La concentración de oxígeno también era continuamente monitorizada a través de una pequeña salida de las cámaras mediante un analizador de O<sub>2</sub> (Sensor Oxyding, Dräger, Lubeck, Alemania). El sistema permite registrar fluctuaciones de presión dentro de la cámara que contiene al animal mediante un transductor diferencial de alta ganancia. Idealmente, la frecuencia de fluctuaciones de la presión se corresponde con la frecuencia respiratoria (fR), pero hay fluctuaciones espurias de la presión debidas a movimientos del animal que son electrónicamente eliminadas. El volumen corriente (VC) es proporcionado por el software del sistema que lo obtiene de la integración de la curva inspiratoria; el sistema se calibra automáticamente tras la inyección en la cámara pletismográfica de un volumen de 5 ml de aire a flujo constante con una jeringa. Esta calibración se realiza a las condiciones ambientales de temperatura, presión y a saturación de vapor de agua. Por tanto para expresar los volúmenes ventilatorios (VC y volumen minuto, VM) en condiciones BTPS los datos se corrigieron por la temperatura corporal de los animales (38° C), a saturación de vapor de agua y a la presión atmosférica de Valladolid (700 mmHg).

Se analizaron la frecuencia respiratoria (fR, respiraciones/minuto), el volumen corriente (VC, ml) y la ventilación total o volumen minuto (VM, ml/min./Kg.), seleccionando para el análisis aquellos periodos donde los animales ventilaron de modo estable. Los datos del transductor eran recogidos mediante una tarjeta de adquisición y el análisis de los datos se realizaba con el software IOX v1.8 de EMCA Technologies. Los datos se graficaban mediante el programa GraphPad Prism 4.

### 3. Exposición a hipoxia crónica.

La exposición de los animales, cobayas y ratas, a hipoxia crónica se realizó en una cámara de vidrio de 120 x 50 x 52 cm. Se trata de una pecera a la que se ha provisto de una tapa de metacrilato que ajusta herméticamente con el cuerpo de la pecera merced a la instalación de una junta de goma en el reborde de la pecera y otra en el perímetro de la tapa. La tapa tiene varias perforaciones distribuidas en toda su superficie que pueden estar tapadas con tapones de goma o ser utilizadas para ventilar la cámara con la mezcla de gases deseada merced a una línea o tubo de goma que resulta de la confluencia mediante un conector en Y de otros dos tubos que llegan desde las balas de gases y a través de caudalímetros de precisión. Ajustando el flujo proveniente de cada bala se consigue la mezcla deseada, que en el caso del cobaya fue de 12% O<sub>2</sub> + 80% N<sub>2</sub> y en el caso de la rata de 10-11% O<sub>2</sub>, resto N<sub>2</sub>; el flujo estable en la cámara es de unos 3 l/min. La línea o tubo que entra en la cámara se distribuye homogéneamente por ésta merced a un tubo en T con pequeñas perforaciones que distribuye el gas. En otro de los orificios de la tapa se coloca un analizador de O<sub>2</sub> (Sensor Oxyding, Dräger, Lubeck, Alemania) que mide la mezcla de gases a su salida de la cámara, lo que permite hacer un ajuste fino de los flujos de aire y nitrógeno de la entrada para obtener mezcla deseada. En otro de los orificios hay un termómetro que permite controlar la temperatura de la jaula a 22-24°C; la temperatura se ajusta merced a dos sistemas, controlando la temperatura de la habitación y modificando el flujo de gases en el interior de la jaula. Finalmente la tapa posee otro orificio abierto a la atmósfera para que no aumente la presión en el interior de la cámara.



**Figura 2MyM.** Sistema de mezcla de gases y cámara de exposición a hipoxia crónica.

La acumulación de CO<sub>2</sub> y vapor de agua en la cámara se evita mediante la renovación del aire y la presencia en el suelo de la cámara de una capa de soda lima. En la cámara se colocaban las jaulas provistas de comida y agua de bebida para los animales (Figura 2MyM). Cada 3 días, se limpiaba y reponía de agua y comida en ≈30 minutos. Tras cada de limpieza, se empleaba un flujo elevado para conseguir la mezcla de gases deseada en un tiempo inferior a 30 minutos. La duración de la hipoxia crónica fue de 15 días.

#### **4. Anestesia y cirugía. Registro de presión arterial.**

Las ratas y los cobayas fueron pesados y anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/Kg.) administrado por vía intraperitoneal. Después de practicarles una incisión longitudinal amplia en el cuello se les realizó una traqueotomía colocando un tubo rígido en el interior de la traquea para evitar su colapso en las ampliaciones del campo quirúrgico. Se localizaron ambos paquetes vásculo-nerviosos del cuello a la altura de la bifurcación carotídea y, tras los clampajes adecuados, dichos paquetes vásculo-nerviosos se extrajeron en bloque y se colocaron en una cámara de lucita que contenía solución Tyrode a 0-4°C (NaCl 140mM, KCl 5mM, CaCl<sub>2</sub> 2mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, Hepes 10mM y glucosa 5mM (pH 7.4 ajustado con NaOH), equilibrado con 100% O<sub>2</sub>. La cámara de lucita esta provista de iluminación fría y con la ayuda de un microscopio de disección (Olimpus) se eliminaban los tejidos próximos al CC hasta dejarlo totalmente libre de tejidos circundantes según muestra la Figura 3MyM.

Los CC una vez disecados eran tratados de distinta forma según su uso posterior. Cuando iban a ser utilizados para medir el contenido endógeno de catecolaminas (CA) eran transferidos directamente a tubos eppendorf conteniendo 80 µl de ácido perclórico 0.1 N y 0.1mM EDTA y procesados para su análisis mediante HPLC (ver más adelante). Cuando iban a ser utilizados para medir síntesis y/o liberación de CA se recolectaban en un vial de vidrio los 8-10 CC que se utilizaban por experimento manteniéndolos en Tyrode a 0-4°C hasta el inicio del experimento propiamente dicho (ver más adelante).

La obtención de las médulas adrenales se realizaba en los mismos animales tras practicar una incisión longitudinal amplia en abdomen y tras localizar ambos riñones se extraían las glándulas suprarrenales que se trasladaban a la cámara de lucita conteniendo Tyrode a 0-4°C. Se eliminaba la grasa circundante y bajo microscopio de disección se eliminaba la corteza suprarrenal que es muy friable y fácilmente distinguible de la médula situada en el centro. Al igual que en el caso del CC el manejo posterior de las médulas

dependía de su uso: para medir contenido endógeno de CA se introducían en eppendorfs conteniendo 500  $\mu$ l de PCA 0.4N y 0.1 mM de EDTA. Para realizar los experimentos de medida liberación de CA se recolectaban las 4-6 glándulas que se utilizaban por cada experimento (ver más adelante).



**Figura 3MyM.** Secuencias de la disección del CC de cobaya (parte superior) y de rata (parte inferior). En la foto de la izquierda, en ambos casos, se observan los distintos componentes del paquete vásculo-nervioso del cuello. En las fotos del centro se observan las bifurcaciones carotídeas, los CC y los nervios del seno carotídeo que naciendo del glossofaríngeo entran en el CC. Finalmente en las fotos de la derecha se muestran los CC y ganglios cervicales superiores disecados en su forma final frente al bisel de una aguja de insulina para obtener una referencia real del tamaño.

Para la medida de presión arterial (PA) los animales eran anestesiados con ketamina más diazepam (100 y 5mg/Kg., respectivamente) administrados en ambos casos por vía intraperitoneal. Se practicaba una incisión en el cuello y se realizaba una traqueotomía conectando los animales a un respirador (CL Palmer; London, UK) ventilándolos a una frecuencia de 40 ciclos/min. y una presión espiratoria positiva de 2 cm de agua. Para registrar el efecto de la hipoxia en los momentos adecuados del experimento, la entrada del respirador se conectaba a un balón relleno de una mezcla de 10% O<sub>2</sub> + 90% N<sub>2</sub>. Se localizaba la carótida común derecha que se canulaba con un catéter de teflón provisto de una llave de tres pasos y relleno de solución salina con heparina. La presión se registraba conectando este catéter a un transductor de presión (Statham), conectado a su vez a una tarjeta de adquisición de datos (Power Lab 16SP; ADI Instruments, Castle Hill, Australia) que envía las señales a un ordenador para su visualización en pantalla y almacenamiento para análisis posterior. El transductor de presión se calibraba con un manómetro de mercurio.

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de la Universidad de Valladolid para el Cuidado y Uso de los Animales.

### **5. Experimentos de síntesis y liberación de CA en CC y médula adrenal.**

La medida de la velocidad de síntesis de CA en el CC tiene interés intrínseco en sí mismo. En condiciones estables la síntesis de CA ocurre a una velocidad adecuada como para mantener los depósitos con un contenido constante. Por tanto la velocidad de síntesis es una medida indirecta de la velocidad de utilización. Por ello, que en un grupo específico de experimentos hemos medido la velocidad de síntesis de CA en CC de cobaya y rata para poder comparar ambas especies (Fidone y González, 1982; Vicario et al., 2000). Para ello, los CC recolectados se incubaban con  $^3\text{H}$ -tirosina, precursor natural de las CA. El medio de incubación, 500  $\mu\text{l}$  de Tyrode equilibrado con aire, contenía 40  $\mu\text{M}$  de  $^3\text{H}$ -tirosina de baja actividad específica (6 Ci/mmol), 100  $\mu\text{M}$  de 6-metil-tetrahydrobiopterina, cofactor estable de la tirosina hidroxilasa, y 1 mM de ácido ascórbico, cofactor de dopamina beta hidroxilasa, el enzima que transforma la DA en NE (Fidone y Gonzalez, 1982). La incubación se realizó durante 2 horas y al finalizar la misma, los CC eran transferidos a viales de vidrio con 10 ml de Tyrode a 0-4°C para lavar la  $^3\text{H}$ -tirosina durante 5 min. Posteriormente, los CC eran pesados en una ultramicrobalanza Sartorius, homogenizados en 80  $\mu\text{l}$  de 0.1N de PCA y 0.1 mM EDTA y tras lavar el homogenizador con 40  $\mu\text{l}$  adicionales de 0.1 N de PCA-EDTA, se combinaba todo en un eppendorf y se centrifugaba. El pellet se resuspendía y se contaba en un contador de centelleo líquido como medida de la incorporación de la  $^3\text{H}$ -tirosina a proteínas. El sobrenadante se congelaba a -80°C hasta su procesamiento por HPLC para medir diferencialmente la síntesis de  $^3\text{H}$ -DA y de  $^3\text{H}$ -NE así como la cantidad de  $^3\text{H}$ -tirosina libre acumulada en el tejido.

Para los experimentos de medida de liberación de CA en el CC, los órganos se incubaban de forma análoga pero el precursor, la  $^3\text{H}$ -tirosina, era de alta actividad específica (de 40-50 Ci/mmol en diferentes batches). Tras las dos horas de síntesis, periodo en el que los depósitos de CA quedan marcados con  $^3\text{H}$ -DA y  $^3\text{H}$ -NE, los CC se lavaban durante 1 h en 4 ml de Tyrode bicarbonato (ver Tabla IMyM) para eliminar el precursor y el pool de las CA marcadas fácilmente liberable (Almaraz et al., 1986) y conseguir una liberación basal razonablemente estable de las CA tritiadas. El medio en que se realizaba el lavado era desechado y luego se procedía a incubar los CC con 4ml



de Tyrode bicarbonato renovando el medio cada 10 min. y recolectándolo para su análisis posterior. Un protocolo típico de un experimento de liberación es el que aparece en el presente esquema que fue descrito originalmente por Fidone et al. (1982):



En todos los periodos de incubación excepto en los periodos de estímulos, los medios estaban equilibrados con 21% O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>, resto N<sub>2</sub>. En los periodos marcados como S (estímulos) la composición de la solución podía variar ya fuera en su PO<sub>2</sub> (estímulos hipóxicos), en su PCO<sub>2</sub>/pH (estímulos ácidos), en su concentración de K<sup>+</sup> (estímulos despolarizantes) o contener diferentes drogas según se señalará en cada caso en los resultados. En cualquier caso, de manera sistemática incluíamos un estímulo de alto K<sup>+</sup>, habitualmente el S3, para asegurarnos de que los CC eran funcionales.

Los medios de incubación preequilibrados con la mezcla de gases deseada se manejan mediante un sistema de jeringas que permite la sustitución rápida de las mismas sin manipular los CC. Durante todos los periodos de incubación la solución era burbujeada con la mezcla de gases correspondiente saturada de vapor de agua, lo que asegura la estabilidad de dichas soluciones en cuanto a su contenido en O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> y pH.

**Tabla IMyM:** Soluciones Tyrode utilizadas en cirugía y en las incubaciones de los tejidos. El pH se ajustó a la temperatura de uso de las soluciones, y en el caso de las soluciones con bicarbonato, tras burbujear de forma adecuada (>15 min.) con la mezcla de gases conteniendo CO<sub>2</sub>.

Compuesto	Tyrode Cirugía	Tyrode Bicarbonato	Tyrode 35mM K <sup>+</sup>	Tyrode 60mM K <sup>+</sup>
NaCl	140 mM	116 mM	86 mM	61 mM
KCl	5 mM	5 mM	35 mM	60 mM
CaCl <sub>2</sub>	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,1 mM	1,1 mM	1,1 mM	1,1 mM
Glucosa	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
HEPES	10 mM	10 mM	10 mM	10 mM
NaHCO <sub>3</sub>	---	24 mM	24 mM	24 mM
pH	7,40	7,40	7,40	7,40

Los medios de incubación se recolectaban en viales con un lecho de ascórbico y acético que daban un pH final 3.2 para evitar la degradación de las CA y se guardaban a 4°C para su posterior análisis en un contador de centelleo. Al final del experimento los CC se homogenizaban en 0.4 N de PCA en un homogenizador cristal-cristal y se

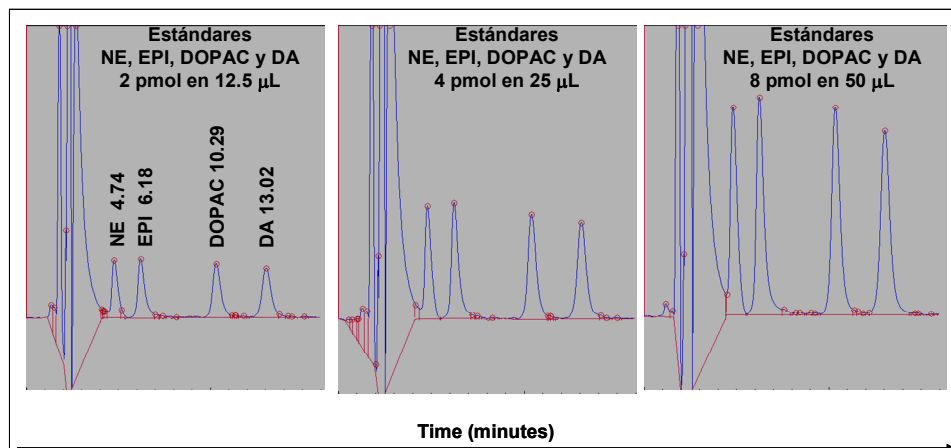
centrifugaban durante 10 min. a 15.000g a 4°C. El sobrenadante era procesado como los medios de incubación para analizar su contenido en <sup>3</sup>H-CA. En médula adrenal los experimentos de liberación se realizaban de manera idéntica, pero dado el alto contenido de CA en la médula adrenal no era necesario marcar isotópicamente los depósitos para medir la liberación.

### **6. Medida de catecolaminas endógenas y marcadas isotópicamente.**

La medida de contenidos endógenos de CA se realizó mediante cromatografía de alta presión con detección electroquímica (HPLC-ED). Según hemos descrito los tejidos se homogenizaban en PCA 0.4 N y 01 mM EDTA que se utilizaba directamente para inyectar en el sistema de HPLC. El sistema de HPLC está compuesto por una bomba programable Waters 600, un inyector Waters 717 y un detector electroquímico BAS LC-4C. Se utilizó una columna en fase reversa (Waters C18) con partículas de 4µm. La fase móvil era un buffer de fosfato (25 mM) conteniendo 0.65 mM octanol sulfato sódico, 0.1mM EDTA y metanol al 6% (pH final 3.46). La sensibilidad del detector se ajustó según las necesidades, baja sensibilidad para los extractos de la médula adrenal, media sensibilidad para los de CC y muy alta sensibilidad para el análisis de los medios de liberación. Además de la sensibilidad del detector, se jugó también con el volumen de la muestra a inyectar que pudo oscilar entre 10 y 200 µl lo que permitía obtener picos fácilmente integrables por el software de análisis (Peak Sample Data Chromatography System software, Buck Scientific, East Norwalk, CT). La identificación y la cuantificación se realizó frente a estándares externos. La Figura 4MyM muestra tres cromatogramas de estándares de norepinefrina (NE), epinefrina (E), dihidroxi-phenil acetic(o) ácido (DOPAC, el principal catabolito de la dopamina) y dopamina (DA).

El análisis de las <sup>3</sup>H-CA presentes en los medios de incubación recolectados cada 10 min. se realiza mediante cromatografía de adsorción. El análisis está basado en la capacidad de la alúmina ácida para adsorber <sup>3</sup>H-CA, y sus catabolitos con estructura catecol, a pH alcalino y la posibilidad de eluirlos a pH ácido (Anton y Sayre, 1962; Fidone y Gonzalez, 1982). La alúmina ácida (100 mg, BioRad) se añade a los viales que contienen las soluciones recolectadas y bajo agitación se alcalinizan a pH 8,6 con Tris buffer 2M. A este pH la alúmina adsorbe los catecoles con gran afinidad. La alúmina se transfiere a columnas de vidrio, se lava con veinte volúmenes de agua destilada para arrastrar cualquier otro producto retenido por la alúmina y finalmente las CA son eluidas con 1 ml de HCl 1N al que se añade líquido de centelleo (Optiphase de Perkin Elmer) para

contar en un contador de centelleo beta (Beckmann). El mismo proceso se sigue para analizar el contenido en  $^3\text{H}$ -CA del sobrenadante resultante de la homogenización de los CC al final del experimento.



**Figura 4MyM.** Cromatogramas de estándares que ponen de manifiesto la linealidad de los cromatogramas así como los tiempos de retención. En condiciones habituales de trabajo los cromatogramas duran 15 minutos. Modificando el tanto por ciento de metanol puede modificarse la duración de los mismos, siendo este aspecto útil cuando han de colectarse las fracciones para separar temporalmente los picos y asegurar su recolección de manera independiente (tomado de Ramírez et al., 2012).

Cuando han de identificarse las  $^3\text{H}$ -CA liberadas, al HCl de elución de las columnas se le añaden CA frías en concentración adecuada para que al inyectar una alícuota de 100-200  $\mu\text{l}$  proporcione un pico nítido. Los efluentes de la columna del sistema de HPLC se colectan cada minuto con un colector de fracciones y se cuentan por centelleo líquido; la radiactividad presente en el efluente de la columna que coincide con el pico de una CA dada representa la  $^3\text{H}$ -CA liberada en el periodo de 10 min del experimento de liberación que estemos analizando en ese momento.

## **7. Estudios morfológicos: Perfusión de los animales, disociación del CC, cultivo de células quimiorreceptoras e inmunocitoquímica. Medida de calcio intracelular.**

En este estudio se han utilizado CC de cobayas y ratas profundidos para observar la estructura general de los secciones histológicas y para ver la riqueza en tejido cromafín en el CC de ambas especies definido por su positividad para tirosina hidroxilasa, el enzima limitante de la síntesis de CA que se expresa de forma específica en las células que sintetizan estas aminas biógenas. En otros experimentos hemos realizado una

disociación enzimática de los CC y tras cultivar las células disociadas durante 24-36 horas hemos examinado las células en campo claro, tras tefirlas para tirosina hidroxilasa y con DAPI para tefir los núcleos celulares y hacer un contaje de todas las células presentes en el cultivo. Finalmente, también disociamos CC para medir  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular con técnicas de microfluorimetría y para registrar corrientes de  $\text{K}^+$  con técnicas de patch-clamp.

### **7.1. Perfusión de los animales.**

Los cobayas y las ratas fueron perfundidas por gravedad (columna de 1 metro de altura) a través del ventrículo izquierdo con 150-200 ml de PBS 10 mM (pH=7.4) a 37°C, seguidos de 250 ml de paraformaldehído al 4% v/v en *buffer* fosfato (PB, 0.1 M) a 4°C. Las bifurcaciones carotídeas fueron aisladas y los CC separados de tejidos adyacentes, fijados durante una hora en para-formaldehído al 4% y transferidos a sacarosa al 30% (w/v; 4°C) en PB 0.1M para crioprotección. Una vez embebidos en Tissue-Tek (Sakura Finetek, Zoeterwoude, Holanda) se congelaron a -20°C.

### **7.2. Disociación de los CC y cultivo de células quimiorreceptoras.**

Los CC aislados fueron disociados enzimáticamente en dos pasos consecutivos. Primero se incubaron en 2 ml de solución Tyrode ( $0 \text{ Ca}^{2+}$  -  $0 \text{ Mg}^{2+}$ ) conteniendo colagenasa (2.5 mg/ml) y albúmina de suero bovino (BSA; 6 mg/ml) a 37°C durante 15 minutos. Segundo, tras aspirar la solución con el enzima, se incubaron nuevamente con 2 ml de la misma solución Tyrode conteniendo 1 mg/ml de tripsina y 6 mg/ml de albúmina a 37°C durante 20 minutos. Se eliminó la solución enzimática, se añadió 1.5 ml de medio de cultivo DMEM (Sigma) a 4°C, y con ayuda de una pipeta Pasteur pulida, se disgregaron los CC mecánicamente. Se centrifugaron las muestras a 2000 rpm durante 8 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 40-50  $\mu\text{l}$  de medio DMEM a 37°C. A continuación se sembraron las células disociadas en cristales de cultivo (*coverslips*) recubiertos con poli-l-lisina (Sigma) en gotas de 15-20  $\mu\text{l}$  y se dejaron en el incubador durante 2 horas a 37°C (20% $\text{O}_2$ , 5% $\text{CO}_2$ , resto  $\text{N}_2$ ) para su adhesión al coverslip sin diseminarse por todo él. Una vez adheridas, se añadió 1 ml de medio DMEM a los pocillos conteniendo los *coverslips* y se incubaron durante 24-36 horas. Las células cultivadas recibieron tres usos distintos: inmunocitoquímica, registro de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y registro de corrientes de  $\text{K}^+$  con la técnica de patch-clamp.

### 7.3. Inmunocitoquímica.

Se obtuvieron secciones seriadas de 10 $\mu$ m de grosor con un criostato (Leitz 1720) que se recogieron en portas de cristal tratados con 3-aminopropiltriethoxi-silano (Sigma). Las secciones se lavaron en PBS a temperatura ambiente durante 5 min. y se incubaron durante 30 min. con solución de permeabilización-bloqueo (*PB* 10mM, NaCl 0,6M, Tritón X-100 0,1% y 2% de suero de cabra no inmunizada) para permeabilizar las células facilitando la entrada del anticuerpo y bloquear las uniones inespecíficas. Después del bloqueo y permeabilización se procede a la incubación con los anticuerpos, previamente diluidos en la propia solución de bloqueo. La incubación con los anticuerpos primarios frente a tirosina hidroxilasa (monoclonal anti-tyrosine hydroxylase antibody, Abcam; dilución 1/1000) se realizó a 4°C durante toda la noche. Después de varios lavados con PBS 10mM, los cortes se incubaron con el anticuerpo secundario (goat antimouse) marcado con FITC (verde) durante una hora en oscuridad y a temperatura ambiente. En la generalidad de los experimentos se incluyó también en la incubación DAPI (azul) para ver tinción de núcleos. Después de otro ciclo de lavados, los cristales se montan sobre portas en medio acuoso con Vectashield H-1000 (Vector Laboratories). Los controles negativos fueron incubados y tratados de modo similar, pero en ausencia de los anticuerpos primarios. Las preparaciones fueron examinadas con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioscop 50 mot *plus*) equipado con filtros de emisión y excitación para FITC. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital refrigerada Photometrics, modelo CoolSnap-cf y analizadas utilizando el programa informático *Metamorph* 6.3. Las áreas positivas a tirosina hidroxilasa se midieron al igual que las de toda la sección y las medidas se usaron para determinar el porcentaje del área de la sección que es positiva para este enzima, esto es, que es tejido cromafín.

Para identificar si las células expresaban tirosina hidroxilasa los cultivos se incubaron con el anticuerpo frente al enzima de forma análoga a como se hizo en los cortes histológicos. Los cultivos conteniendo las células quimiorreceptoras disociadas en fresco se lavaron tres veces con 1ml de PBS (fosfato 10mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) para eliminar los restos de rojo 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 temperatura ambiente durante 10 minutos y se repitieron los lavados con PBS 10mM. Una vez fijadas las células y antes de la incubación con los anticuerpos, se incubaron durante 30 min con solución de permeabilización-bloqueo (*PB* 10mM, NaCl 0,6M, Tritón X-100 0,1% y 2% de suero de cabra no inmunizada) para

permeabilizar las células facilitando la entrada del anticuerpo y bloquear las uniones inespecíficas. Después del bloqueo y permeabilización se procedió a la incubación secuencial con los anticuerpos, previamente diluidos en la propia solución de bloqueo. La incubación con los anticuerpos primarios frente a tirosina hidroxilasa (dilución 1/1000) se realizó a 4°C durante toda la noche. Tras varios lavados con PBS 10mM, las células se incubaron con el anticuerpo secundario marcado con FITC (verde) durante una hora en oscuridad y a temperatura ambiente. Teniendo en cuenta que las células quimiorreceptoras son de origen neuroectodérmico y expresan tirosina hidroxilasa, la riqueza de los cultivos en estas células nos define de forma semicuantitativa la riqueza del CC en tejido quimiorreceptor. La tinción de los núcleos con DAPI nos permite cuantificar en términos relativos esa riqueza en tejido quimiorreceptor (número de células positivas a tirosina hidroxilasa/100 células (núcleos)). Después de otro ciclo de lavados, los cristales se montaron sobre portas en medio acuoso con Vectashield H-1000 (Vector Laboratories). Los controles negativos se incubaron en ausencia del anticuerpo primario. El microscopio y sistema de adquisición de imágenes fue el mismo que el utilizado para examinar los cortes histológicos.

#### **7.4. Medida de Ca<sup>2+</sup> intracelular.**

Para la medida del Ca<sup>2+</sup> intracelular las placas de cultivo o coverslips fueron incubadas con Fura-2 en su forma permeable o acetoxi-metil-ester (Fura-2 AM; 10 μM, Molecular Probes) diluido en Tyrode Hepes con 0.1% (v/v) de Pluronic F-127 (Molecular Probes) a 20°C durante 30 minutos. Una vez que el Fura-2 AM penetra en las células, esterases inespecíficas del citoplasma celular eliminan el grupo acetoxi-metil y dejan libre el Fura-2 que es muy poco permeable a las membranas celulares con lo que las células se van cargando de Fura-2 durante el periodo de incubación. Tras este periodo de "carga" las placas de cultivo se montan en una cámara de perfusión situada en la platina de un microscopio invertido (Nikon Diaphot 300) donde son superfundidas con una solución salina equilibrada a pH 7.4 y 37°C (116mM NaCl, 5mM KCl, 1.1mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 10mM glucosa, 10mM Hepes). Se realizó la medida de la fluorescencia de Fura-2 a dos longitudes de onda con un sistema DX-1000 (Solamere Technology Group, Salt Lake City, Utah). Se empleó una lámpara de mercurio de 100W como fuente de luz (Optiquip, Nueva York) que se enfocó y colectó a través de un objetivo Nikon Fluor 40/1.30. La longitud de onda de excitación osciló alternativamente de 340 a 380 nm, y la fluorescencia de emisión a 540 nm fue colectada con una cámara digital SensiCam (PCO CCD Imaging, Kelheim, Alemania). La iluminación y la cámara se

controlaron con software de Axon (Imaging Workbench 4.0; Axon Instruments, CA, USA). Las medidas de calcio se realizaron *offline* a partir de la sustracción de las imágenes obtenidas como *background* y las obtenidas para f340 y f380 y gracias a los parámetros de calibración introducidos en determinados experimentos independientes (ver Vicario et al., 2000). Con frecuencia, los resultados se expresan como el ratio o proporción de la emisión obtenida cuando se estimula a 340 vs. la obtenida cuando se estimula 380 (F340/F380). Los estímulos empleados fueron distintos en cada experimento y los protocolos precisos de estimulación se mostrarán en los Resultados. Para obtener respuestas medias a los distintos estímulos se realizó con el software apropiado una integral acumulativa (running integral) de los ratios de la fluorescencia tal como describen Gómez-Niño et al. (2009).

En algunos experimentos, al finalizar los registros de  $\text{Ca}^{2+}$ , las células fueron teñidas para tirosina hidroxilasa. Tras una fijación con paraformaldehído al 2% (v/v) durante 15 min a 20°C, las células fueron lavadas con solución permeabilizante y bloqueadas con solución de permeabilización-bloqueo durante 10 min. Los anticuerpos para tirosina hidroxilasa fueron diluidos en la solución de bloqueo e incubados con las células durante 30 min. Después de varios lavados en la solución de permeabilización-bloqueo las células fueron incubadas con anticuerpos secundarios FITC conjugados goat anti-mouse durante otros 30 min. Tras el lavado con PBS el marcaje de TH fue examinado empleando un juego de filtros adecuado. De esta forma se tuvo identificación inmunocitoquímica de las células registradas como células quimiorreceptoras.

### **7.5. Registro de las corrientes de $\text{K}^+$ : estudios electrofisiológicos.**

Las células eran pegadas a los coverslips y colocadas en una camarita de superfusión de 0.5 ml de volumen, eran perfundidas a un flujo de 2 ml/min con una solución (solución externa) que contenía en mmol/L: NaCl 141, KCl 4.7,  $\text{MgCl}_2$  1.2,  $\text{CaCl}_2$  1.8, glucosa 10, y HEPES 10; el pH se ajustó a 7.4 con NaOH 1N y la solución se mantuvo equilibrada con aire (aproximadamente 150 mmHg de  $\text{PO}_2$ ). La solución interna que rellena el electrodo de registro tenía la siguiente composición en mmol/L: KCl 125,  $\text{MgCl}_2$  4, MgATP 5, NaGTP 5, HEPES 10, EGTA 10; el pH se ajustó a 7.2 con KOH. Células quimiorreceptoras aisladas (no formando clusters) fueron sometidas a pinzamiento de voltaje y las corrientes a través de la membrana celular fueron registradas utilizando la técnica de *patch-clamp* en su configuración de *whole-cell*. Se utilizó un amplificador Axopatch-200B (Axon Instruments, Burlingame, CA, U.S.A) procediendo como describen Cogolludo et al. (2009). Las corrientes registradas se filtraron a 3kHz,

digitalizadas con un convertidor analógico digital Digidata 1200 (Axon Instruments) y almacenadas para su análisis *offline*. Las corrientes se evocaban por la aplicación de pulsos despolarizantes de 50 ms. de duración desde un potencial de -60 a +30 mV en incrementos de 10 mV, tal como describe Riesco-Fagundo et al. (2001). Las corrientes registradas se normalizaron por la capacitancia celular y se expresaron como pA/pF. Las relaciones corriente-voltaje (curvas I/V) se construyeron midiendo las corrientes al finalizar el pulso de despolarización de 50 ms. Para registrar el efecto de la hipoxia sobre las corrientes de K<sup>+</sup>, las células se profundieron durante 10 min con la misma solución anterior pero equilibrada con N<sub>2</sub>, que en la camarita proporciona un PO<sub>2</sub> de 15-25 mmHg. En algunos experimentos la solución de perfusión contenía 5 mM de tetraetil-ammonio (TEA, 5 mmol/L), un inhibidor de corrientes de K<sup>+</sup>. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22 a 24°C).



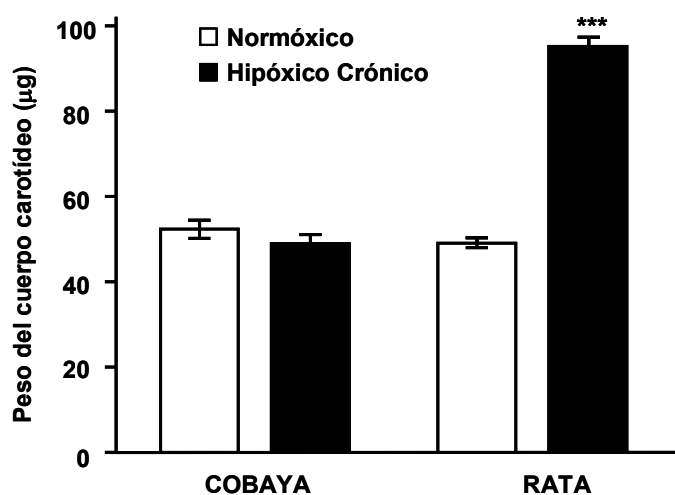
## **RESULTADOS**



La sección de Resultados está dividida en seis apartados principales con títulos idénticos a los de los objetivos. Cada uno de los apartados se organiza en subapartados para facilitar la lectura de la sección como un todo.

### 1. Identificar posibles diferencias en la morfología y morfometría básicas del CC de cobaya y de rata.

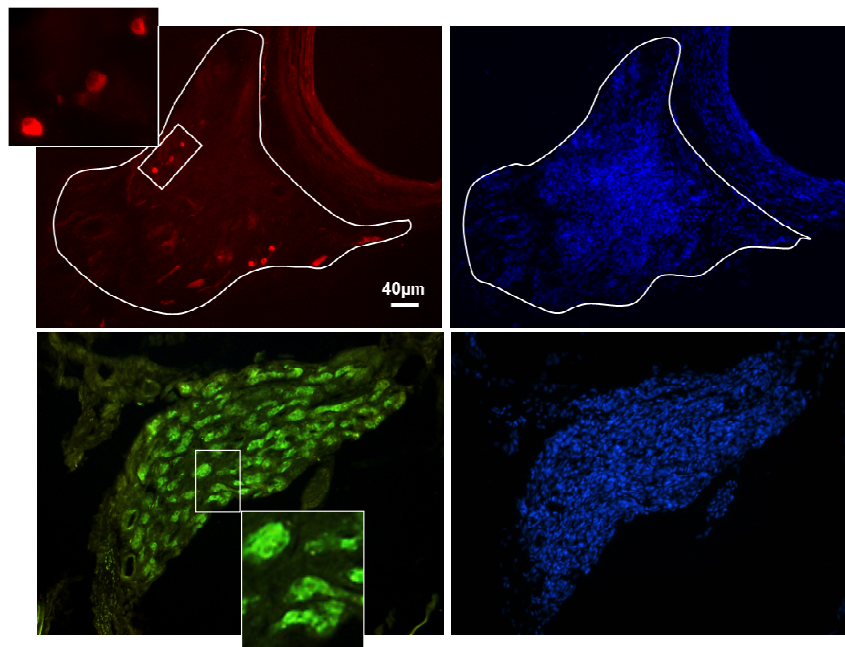
Según se ha mostrado en la sección de Material y Métodos, macroscópicamente no se aprecian diferencias llamativas en los CC de ambas especies. La media de los pesos de 60 CC de cobayas normóxicos fue de  $54 \pm 2,5 \mu\text{g}$  y la media de los pesos de 267 CC de rata utilizados en éste y otros estudios del laboratorio fue de  $48 \pm 1.7 \mu\text{g}$  (Figura 1R). Dado que existe una relación directa entre el peso del animal y el del CC, y que los cobayas tuvieron aproximadamente un peso 3 veces mayor, podríamos decir que el CC del cobaya es hipotrófico respecto al de rata, conejo y gato (González, 1977).



**Figura 1R.** Peso del CC de cobaya y de rata. Normóxico hace referencia a animales controles que han vivido de forma permanente en atmósfera normal e Hipóxico Crónico hace referencia a animales que han sido expuestos a una atmósfera de 10-12% de O<sub>2</sub> durante 15 días. Los datos son medias  $\pm$  SEM de 60 CC normóxicos y 34 hipóxicos crónicos en cobaya y de 267 CC normóxicos y 96 hipóxicos en rata (los datos de rata se han obtenido de este y otros estudios del laboratorio). \*\*\* $p < 0.001$  vs. normóxicos.

La exposición a hipoxia sostenida (10-12% O<sub>2</sub>; 15 días) no modificó el tamaño del CC de cobaya, mientras que casi duplicó el tamaño del CC de rata (Figura R1). Esta hipertrofia el CC, se debe en gran medida a proliferación de los vasos aunque también hay aumento del tamaño y en menor medida del número de CQ (Kay y Laidler, 1977). Estos cambios estarían mediados por factor de crecimiento vascular dependiente de endotelio (VEGF) producido en las CQ (Tipoe y Fung, 2003). Presumiblemente la hipoxia no generaría VEGF en las CQ del cobaya. En ambas especies la hipoxia aumentó el hematocrito: en cobaya de  $40 \pm 1$  a  $45 \pm 2\%$  y en rata de  $47 \pm 3$  a  $62 \pm 1\%$ .

Las Figuras 2R y 3R presentan de forma cualitativa los rasgos morfológicos e histoquímicos fundamentales del CC de cobaya en comparación con el de la rata y la imagen típica de un cultivo primario en ambas especies.

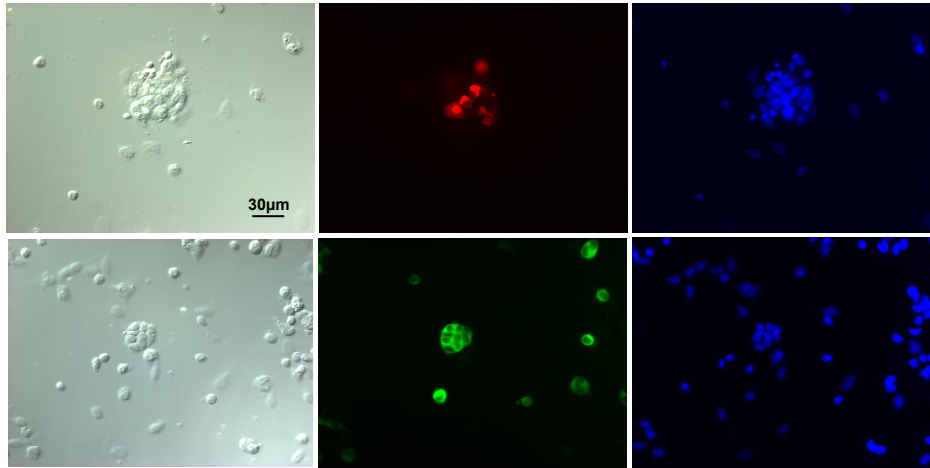


**Figura 2R.** En la parte superior se muestra, a la izquierda una sección a pequeño aumento de un CC de cobaya teñido para tirosina hidroxilasa (rojo) y a la derecha la misma sección teñida con DAPI para mostrar la celularidad del CC. El recuadro muestra una ampliación del área seleccionada. En la parte inferior la secuencia es la misma pero en un CC de rata y a los mismos aumentos.

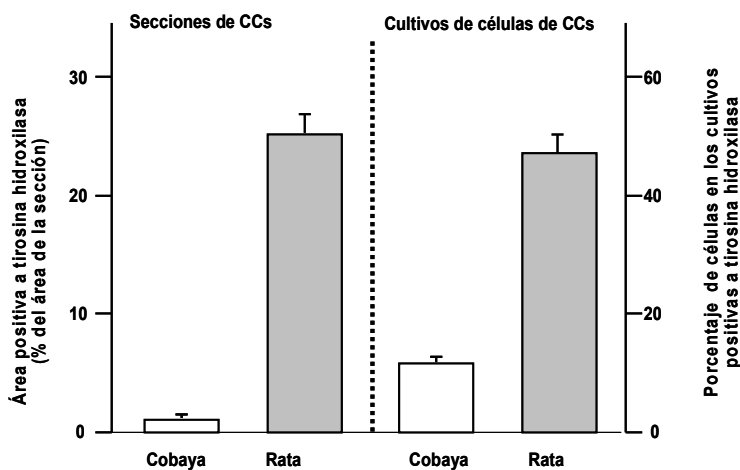
Resulta evidente que el área inmunopositiva para tirosina hidroxilasa es mucho menor en cobaya que en rata, lo que implicaría que el número de CQ sea mucho menor. En el corte de cobaya se ven estructuras filiformes positivas que serían terminaciones simpáticas y que en la rata no se aprecian tan fácilmente porque la gran densidad de células tirosina hidroxilasa positivas las enmascara. Del mismo modo en los cultivos de CC disociados se comprueba que el número de células positivas es menor en cobaya que en rata.

La Figura 4R presenta datos cuantitativos de nuestro estudio. Se cuantificaron las áreas tirosina hidroxilasa positivas en 64 cortes obtenidos de 4 CC de cobaya y en 150 secciones obtenidas de 4 CC rata. El grosor de las secciones fue de 10 µm. En los cultivos se contaron 604 células (núcleos) de cobaya y 770 células de rata provenientes en ambos casos de tres cultivos distintos. En cobaya la superficie positiva para tirosina hidroxilasa fue el  $1,07 \pm 0,05\%$  de la superficie total de las secciones y en la rata fue del

25 ± 1.75%. De las células contadas el 11.25% en el cobaya y el 45% en la rata fueron positivas para tirosina hidroxilasa.



**Figura 3R.** En la parte superior se muestra, a la izquierda una imagen de microscopio de campo claro de un cultivo de células disociadas de CC de cobaya; en el centro se presenta el mismo campo teñido para tirosina hidroxilasa (TH, en rojo) y a la derecha los núcleos de las células teñidos con DAPI (barra de calibración: 30µm en todos los casos). En la parte inferior se muestra la misma secuencia de un cultivo de células obtenido de un CC de rata a los mismos aumentos.



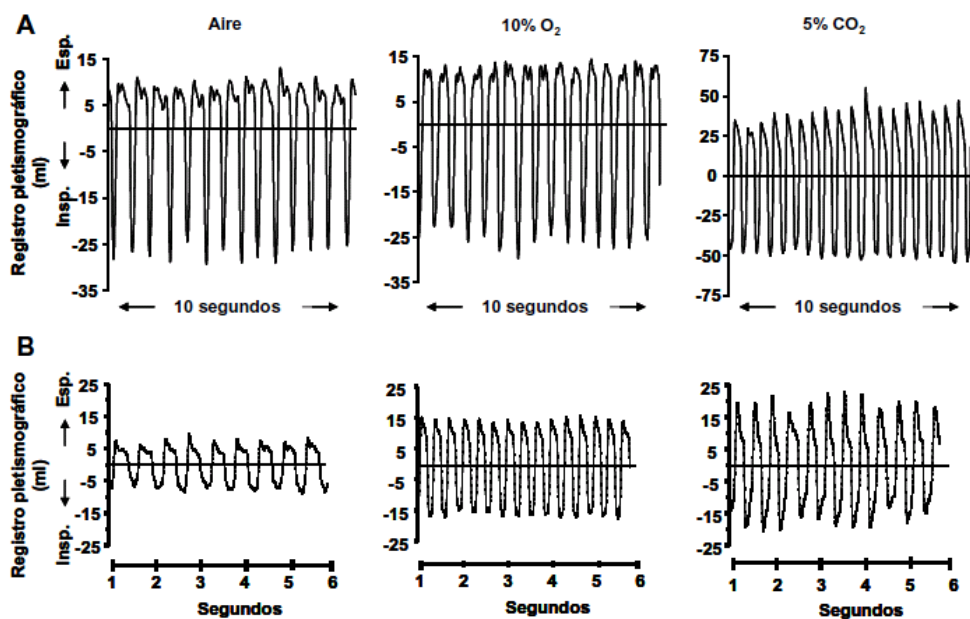
**Figura 4R.** Datos morfométricos básicos referidos a la positividad para tirosina hidroxilasa obtenidos de secciones y cultivos primarios de CC de cobaya y rata.

En su conjunto, pues, los datos presentados en estas tres figuras indicarían que el número de células potencialmente quimiorreceptoras es mucho menor en cobaya que en rata. De hecho, sólo en el CC humano se ha descrito un porcentaje tan pequeño de células TH positivas (Ortega-Sáenz et al., 2013). Según veremos más adelante, el contenido total de CA en el CC de cobaya vs. rata y la densidad de células/campo microscópico consideradas quimiorreceptoras por su respuesta de aumento de Ca<sup>2+</sup>

intracelular frente a la estimulación hipóxica concuerdan razonablemente con los datos inmunocitoquímicos.

## 2. Verificar si el cobaya hiperventila o no en respuesta a los estímulos hipóxico e hipercápnico estudiando el proceso de aclimatación a la hipoxia crónica.

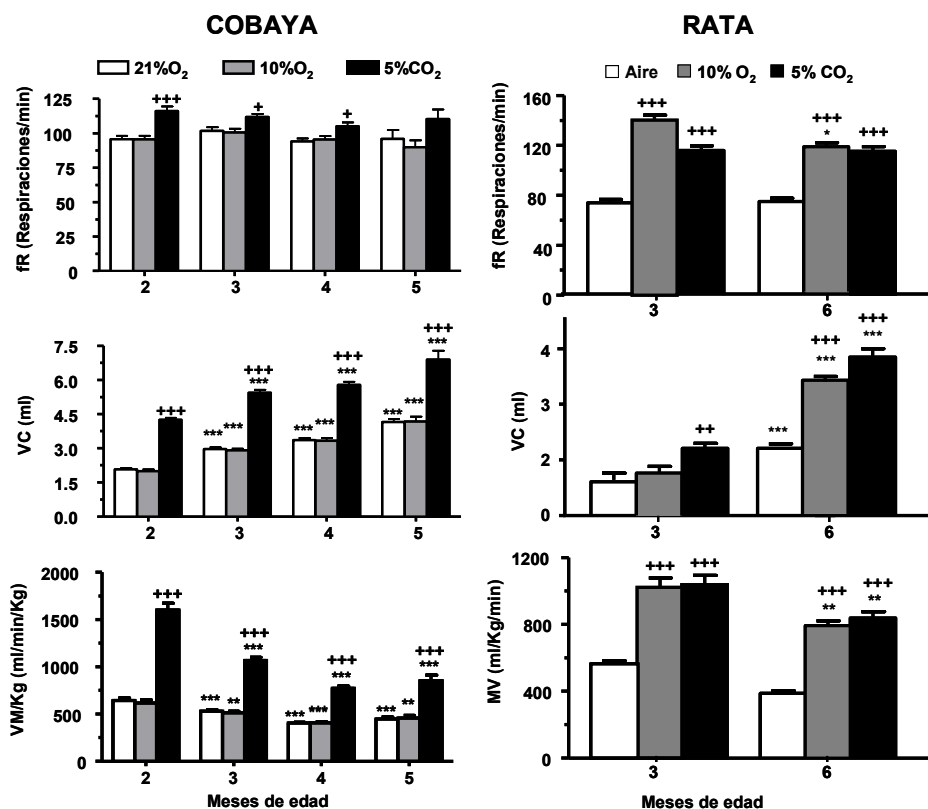
Una parte significativa de los datos de este apartado ya han sido publicados (Olea et al., 2011, 2012). La figura 5R muestra registros pleτισmográficos típicos obtenidos en cobaya (Figura 5A) y en rata (Figura 5B). Aunque de forma cualitativa (nótese las escalas en ordenadas), la Figura 5R muestra que en cobaya mientras la hipoxia no aumenta ni la frecuencia respiratoria (fR) ni el volumen corriente (VC), la hipercapnia aumenta ambos parámetros. En la rata tanto la hipoxia como la hipercapnia aumentan la fR y el VC.



**Figura 5R.** Registros pleτισmográficos típicos obtenidos en un cobaya (A) y en una rata (B) de 3 meses. Obsérvese que mientras en el cobaya la hipoxia no altera la frecuencia ni el volumen corriente de forma apreciable, en rata hay un aumento marcado de ambos parámetros respiratorios. En respuesta a la hipercapnia, sin embargo, el aumento de frecuencia y volumen corriente ocurre en ambas especies.

La Figura 6R compara la fR, el VC corriente y el volumen/min./Kg. de peso (VM/Kg) en cobaya de 2 a 5 meses y en ratas de 3 y 6 meses. En cobaya en normoxia entre 2 y 5 meses de edad la fR no varió y fue de  $96 \pm 3$  y  $96 \pm 6$  respiraciones/min. a los 2 y 5 meses, respectivamente. En rata en normoxia la fR tampoco varió entre 3 y 6 meses y fue, respectivamente,  $77 \pm 3.7$  y  $79 \pm 3.2$ . La hipoxia aguda (10 min., 10% O<sub>2</sub>), no

modificó la fR en cobaya a ninguna edad, mientras que en rata la aumentó a  $140 \pm 5.2$  y a  $120 \pm 3.4$  a los 3 y 6 meses. La hipercapnia aguda (5% CO<sub>2</sub> en aire durante 10 min.) en cobaya aumentó de forma moderada la fR a todas las edades siendo el aumento máximo a los 2 meses, edad en la que alcanzó  $118 \pm 6$  respiraciones min. En la rata, la hipercapnia aumento la fR a  $116 \pm 4.1$  a ambas edades estudiadas.



**Figura 6R.** Frecuencia respiratoria, volumen corriente y ventilación/min./Kg. de peso en cobayas y ratas de distintas edades. Los datos son medias  $\pm$  SEM de 8 datos en todos los grupos de cobayas y de 8 a 12 en rata. +p<0.05; ++p<0.01; +++p<0.001 vs. normoxia a dos meses en cobaya y a 3 meses en la rata. En el cobaya, cuando se compara con la situación de normoxia en cada edad, la hipercapnia aumentó la frecuencia de forma moderada a todas las edades y el volumen corriente y el volumen minuto/Kg prácticamente se duplicaron a todas las edades (+++ p<0.001). En la rata, las diferencias de edad son menos marcadas. A los tres meses, la hipoxia y la hipercapnia aumentaron el volumen/minuto/Kg de  $485 \pm 13$  en normoxia a  $1010 \pm 42$  en hipoxia y a  $1040 \pm 60$  en hipercapnia y a los 6 meses aumentaron de  $395 \pm 10$  en normoxia a  $810 \pm 22$  y a  $830 \pm 250$  (n= 8-12; p<0.001 en ambos casos).

En normoxia, el VM/Kg disminuyó con la edad en el cobaya ya que, aunque la fR se mantuvo y el VC aumentó progresivamente, el peso corporal de los cobayas creció más deprisa de 260 g a los dos meses a 890 g a los 5 meses con lo que el VM/Kg disminuyó de 740 ml/Kg/min. a 485 ml entre los 2 y los 5 meses. En rata en normoxia el VM/Kg también disminuyó con la edad pero de forma más moderada de  $485 \pm 13$  a  $395 \pm 10$  ml/Kg/min. La hipoxia no modificó el VM/Kg en cobaya a ninguna edad, pero en la rata

lo duplicó a las dos edades estudiadas. La hipercapnia básicamente duplicó el VM/Kg de peso en ambas especies y a todas las edades.

Resumiendo de forma cualitativa los datos más importantes son: a) En cobaya la hipoxia aguda no modificó ninguno de los tres parámetros a ninguna edad, mientras que en la rata tanto a los 3 como a los 6 meses produce un aumento marcado de la fR y a los seis meses un aumento del VC; a ambas edades se observó un aumento marcado (aproximadamente lo duplica) del VM/Kg. b) La hipercapnia produce un discreto aumento de la fR en cobaya y un aumento muy marcado en rata, aumentando en ambas especies el VC y la VM/Kg. c) En cobaya hay un aumento marcado del VC con la edad, pero el aumento de peso corporal es proporcionalmente mayor por lo que el VM/Kg disminuye en todas las condiciones (aire, hipoxia e hipercapnia) a medida que los cobayas se hacen adultos; en la rata el efecto de la edad entre 3 y 6 meses es menos marcado, pero también en todas las condiciones es menor a medida que envejecen. d) En valores absolutos, el volumen/minuto/Kg. es comparable en cobaya y rata, aunque a los dos meses es claramente mayor en cobaya que en rata.

**Tabla IR.** Tiempos y flujos ventilatorios en cobaya y rata de distintas edades en normoxia.

<b>COBAYA</b>					
<b>Edad (meses)</b>	<b>TI (ms)</b>	<b>TE (ms)</b>	<b>TI/Tt (%)</b>	<b>VC/TI (ml/s)</b>	<b>VC/TE (ml/s)</b>
<b>2</b>	262.9 ± 7.3	397.3 ± 12.1	39.8	7.83	5.18
<b>3</b>	244.9 ± 7.0	372.3 ± 10.3	39.5	12.08	7.95
<b>4</b>	265.7 ± 7.0	402.1 ± 9.9	39.7	12.60	8.33
<b>5</b>	256.6 ± 14.9	409.8 ± 25.4	38.5	16.17	10.12
<b>RATA</b>					
<b>3</b>	297 ± 9.5	430 ± 15.0	40.8	5.11	3.49
<b>6</b>	293 ± 10.3	427 ± 12.3	41.5	8.25	5.64

Otros parámetros ventilatorios de interés se recogen en la Tabla IR. No hay diferencias relacionadas con la edad en los tiempos inspiratorios (TI) y espiratorios (TE) y ambos son similares en ambas especies; además, en ambas especies, la inspiración dura en torno al 40% del ciclo respiratorio (TI/Ttotal). Tanto el flujo inspiratorio (VC/TI) como el espiratorio (VC/TE) aumentan con la edad.

La Tabla IIR muestra el efecto de la exposición a hipoxia crónica (10-12% O<sub>2</sub>; 15 días) sobre el patrón respiratorio y el volumen ventilatorio/minuto en cobaya y rata. Como puede observarse mientras que en el cobaya no se modificó ninguno de los parámetros ventilatorios, en la rata, la exposición a hipoxia crónica produjo un aumento del VM/Kg en



normoxia, hipoxia e hipercapnia, siendo el aumento debido fundamentalmente a expensas de un aumento del VC.

**Tabla IIR.** Efecto de la exposición a hipoxia (10-12% O<sub>2</sub>) crónica (15 días) sobre el patrón respiratorio y el volumen ventilatorio/minuto en cobaya y rata.

### COBAYA

Condición/ Parámetro	Aire		10% O <sub>2</sub>		5% CO <sub>2</sub>	
	Control	H Crónica	Control	H Crónica	Control	H Crónica
fR (Resp/min)	96.0 ± 6.4	83.2 ± 4.4	89.9 ± 5.0	93.8 ± 4.5	110.2 ± 7.1	86.6 ± 3.7
VC (ml)	4.1 ± 0.1	4.0 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.5 ± 0.2	6.9 ± 0.4	7.7 ± 0.3
VM (ml/kg/min)	446 ± 23	389 ± 2	455 ± 28	506 ± 19	852 ± 58	760 ± 30

### RATA

fR (Resp/min)	77 ± 3.7	85 ± 4.1	140 ± 5.2	132 ± 4.8	116 ± 4.1	122 ± 5.0
VC (ml)	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.2	2.21 ± 0.3**	2.3 ± 0.2	3.5 ± 0.3***
VM (ml/kg/min)	485 ± 13	650 ± 16**	1010 ± 42	1212 ± 56**	1040 ± 60	1560 ± 55***

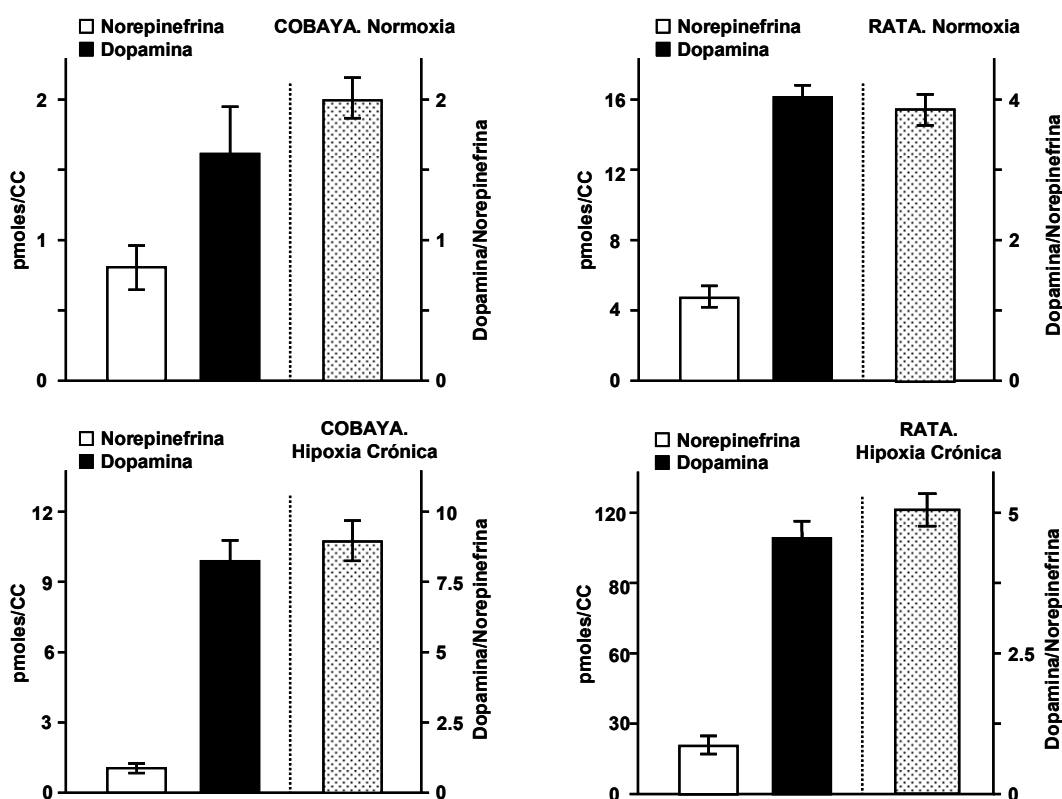
Los datos son medias ± SEM de 8 valores individuales en cobaya y de 8 a 12 en la rata. \*\*p<0.01 y \*\*\*<0.001 vs. normoxia.

### 3. Caracterizar el metabolismo de CA en el CC de cobaya, en particular la liberación en respuesta a la hipoxia y a otros estímulos clásicos del CC.

#### 3.1. Contenido, síntesis y turnover de CA.

En el apartado anterior hemos estudiado la función del CC por sus efectos reflejos en otros órganos como diría Fernando de Castro (1928; ver González et al., 2014), de forma más específica por su efecto sobre la función respiratoria o ventilatoria, la principal diana del reflejo quimiorreceptor. Como hemos visto, sin embargo, hay diferencias notables entre cobaya y rata: mientras que en la rata la ventilación aumenta en respuesta a la hipoxia y a la hipercapnia, en el cobaya la hipoxia no genera una respuesta ventilatoria. Teniendo en cuenta que la doctrina vigente es que el CC es el responsable de toda la ventilación generada por la hipoxia, cabe preguntarse: ¿de qué carecen las CQ del CC para que no respondan a la hipoxia? Dado que en ratón, rata, conejo y gato al menos la liberación de CA por las CQ es un índice de su nivel de actividad durante la estimulación con una gran variedad de estímulos (González et al., 1992; Rigual et al., 2002; Ortega-Saenz et al., 2010), en esta sección vamos a explorar la funcionalidad de las CQ midiendo sus actividad secretora de CA frente a diversos estímulos.

Como puede verse en la Figura 7R los niveles de norepinefrina (NE) y dopamina (DA) en condiciones controles o de normoxia en cobaya son de  $0.80 \pm 0.10$  y  $1.6 \pm 0.4$  pmol/CC, respectivamente, mucho menores que en rata  $4.57 \pm 0.32$  y  $16.27 \pm 1.47$  pmol/CC. Teniendo en cuenta que el peso del CC de cobaya es ligeramente mayor que el de rata (Figura 1R) esto implica que el CC de cobaya tiene  $\approx 1/6$  de la concentración de NE y menos de  $1/10$  de la concentración de DA que el CC de rata, datos estos que concuerdan con la densidad de células TH-positivas de la Figura 4R. La relación DA/NE en el CC de cobaya es de 2 y en rata es de en torno a 4; esto es, en ambas especies los CC son dopaminérgicos, más en el caso de la rata.

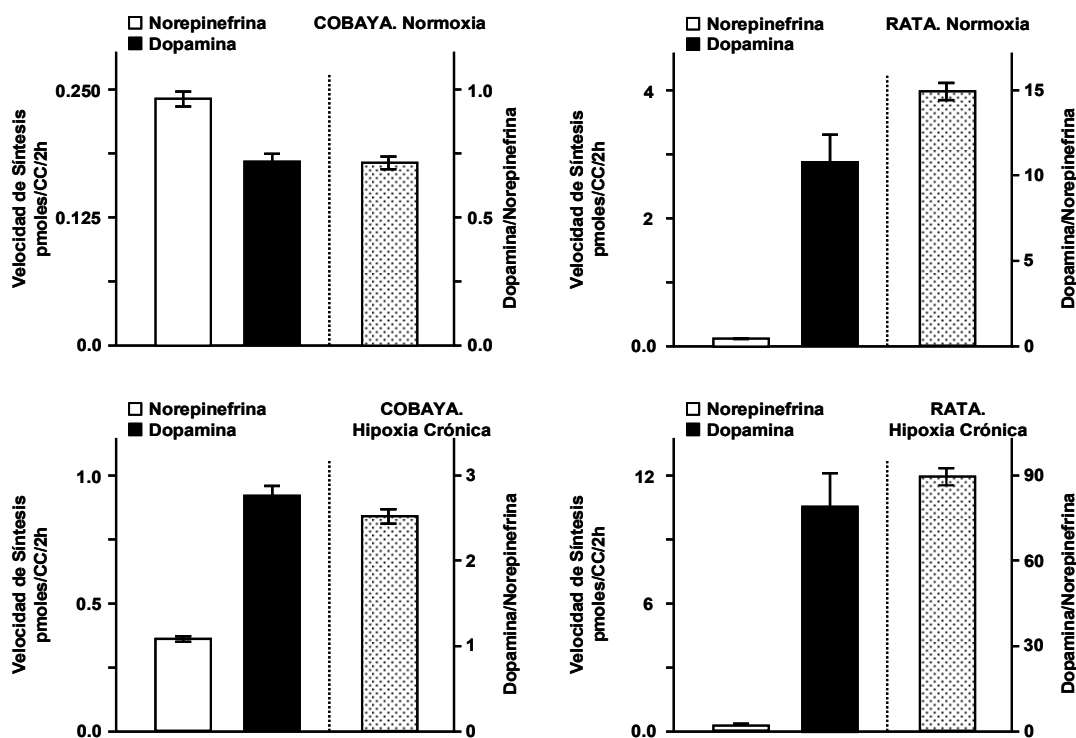


**Figura 7R.** Contenido de NE y DA en el CC de cobaya y rata en animales normóxicos y sometidos crónicamente a hipoxia (10-12% O<sub>2</sub>, 15 días). Medias  $\pm$  SEM de 8 a 12 más valores individuales.

En cobayas, la hipoxia crónica, aumentó la NE a  $1.15 \pm 0.10$  ( $\approx 1.5$  veces) y la DA a  $9.99 \pm 0.8$  ( $\approx 6$  veces) pmol/CC; en rata a  $19 \pm 6$  ( $\approx 4$  veces) la NE, y a  $110 \pm 11$  ( $\approx 7$  veces) pmol/CC la DA; la relación DA/NE en cobaya aumentó  $\approx 8.5$  veces y en rata  $\approx 5$  veces.

La Figura 8R muestra la velocidad de síntesis de NE y DA en CC de cobaya y rata normóxicos e hipóxicos crónicos. Las velocidades de síntesis de <sup>3</sup>H-NE y de <sup>3</sup>H-DA en cobaya normóxica fueron de 0.23 y 0.16 pmole/CC/2h y en rata de 0.18 y 2.8, respectivamente. Las relaciones de las velocidades de síntesis de <sup>3</sup>H-DA/<sup>3</sup>H-NE fueron de

0.70 en cobaya y de 14,5 en la rata. En cobayas hipóxicas crónicas las velocidades de síntesis de  $^3\text{H-NE}$  y de  $^3\text{H-DA}$  aumentaron a 0.35 ( $\approx 1,5$  veces) y 0.89 ( $\approx 5,5$  veces) pmole/CC/2h con lo que la relación de velocidades de síntesis  $^3\text{H-DA}/^3\text{H-NE}$  aumentó a 2.5 ( $\approx 3,5$  veces); en ratas hipóxicas crónicas las velocidades de síntesis de  $^3\text{H-NE}$  y de  $^3\text{H-DA}$  aumentaron, respectivamente a 0.4 (2 veces) y a 11 (4 veces) pmole/CC/2h con lo que la relación de velocidades de síntesis  $^3\text{H-DA}/^3\text{H-NE}$  a 85 (5,5 veces).



**Figura 8R.** Velocidad de síntesis de NE y DA en el CC de cobayas y ratas normóxicas e hipóxicas crónicas. Los datos son medias  $\pm$  SEM de 8 a 12 datos individuales.

La Tabla IIIR muestra los tiempos de turnover (contenido/velocidad de síntesis) de DA y NE en los CC de ambas especies y en ambas condiciones experimentales.

Dado que en ambas especies una parte importante de la NE está contenida en terminaciones simpáticas provenientes del GCS (Mir et al., 1982), para obtener una idea más precisa de lo que está ocurriendo en las CQ estudiamos el contenido, síntesis y calculamos el tiempo de turnover de CA en GCS en condiciones controles de normoxia y en hipoxia crónica (Tabla IVR).

En cobaya aumenta el contenido y la velocidad de síntesis de NE en HC con una discreta disminución del tiempo de turnover; esto es, las terminaciones simpáticas

## RESULTADOS

estarían vertiendo más NE al torrente circulatorio en el animal hipóxico crónico. Algo comparable ocurre con la DA pero sin aumentar los depósitos de DA. En rata por el contrario parecería existir una menor utilización de NE en hipoxia crónica.

**Tabla IIIR.** Tiempos de turnover de DA y NE en CC de cobaya y rata en normoxia e hipoxia crónica

Tiempo de Turnover	COBAYA		RATA	
	Normoxia	Hipoxia	Normoxia	Hipoxia
<b>Dopamina</b>	19.4 ± 2.9	21.9 ± 2.2 <sup>ns</sup>	11.2 ± 1.1	19.8 ± 1.6 <sup>**</sup>
<b>Norepinefrina</b>	6.7 ± 1.8 <sup>+++</sup>	6.35 ± 0.9 <sup>+++</sup> , <sup>ns</sup>	49.9 ± 3.9 <sup>***</sup> , <sup>+++</sup>	95.8 ± 8.8 <sup>***</sup> , <sup>+++</sup>

Medias ± SEM de 8 a 12 datos. ns, no significativo normoxia vs. hipoxia; \*\*p<0.001 normoxia vs. hipoxia; ++p<0.01 significativamente menor el tiempo de turnover de NE que el de DA en cobaya y +++p<0.001 significativamente mayor el tiempo de turnover de NE que el de DA en rata.

**Tabla IVR.** Contenido, síntesis y tiempo de turnover de CA en el ganglio cervical superior de rata y cobaya. Efectos de la hipoxia crónica.

GANGLIO CERVICAL SUPERIOR		COBAYA		RATA	
		Normoxia (n=5)	Hipoxia Crónica (n=8)	Normoxia (n=19)	Hipoxia Crónica (n=14)
Contenido en CA (pmole/mg)	NE	62.4 ± 4.5	94.4 ± 11.5 <sup>**</sup>	107.3 ± 4.56	119.4 ± 2.8
	DA	48.8 ± 6.1	52.5 ± 4.5	8.3 ± 1.89	11.2 ± 2.1
	DA/NE	0.78 ± 0.08	0.59 ± 0.07	0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.03
Síntesis de CA (pmole/mg/h)	<sup>3</sup> H-NE	5.3 ± 0.5	10.9 ± 1.5 <sup>**</sup>	2.8 ± 0.2	2.0 ± 0.3
	<sup>3</sup> H-DA	5.9 ± 0.9	11.4 ± 1.8 <sup>**</sup>	1.7 ± 0.2	1.9 ± 0.1
	<sup>3</sup> H-DA/ <sup>3</sup> H-NE	1.14 ± 0.15	1.09 ± 0.12	0.63 ± 0.05	0.93 ± 0.07
Tiempo de turnover (h)	NE	11.8 ± 0.5	8.4 ± 0.5 <sup>*</sup>	37.5 ± 1.2	59.4 ± 1.4 <sup>**</sup>
	DA	8.5 ± 0.4	4.6 ± 0.3 <sup>***</sup>	5.8 ± 1.1	6.0 ± 0.7

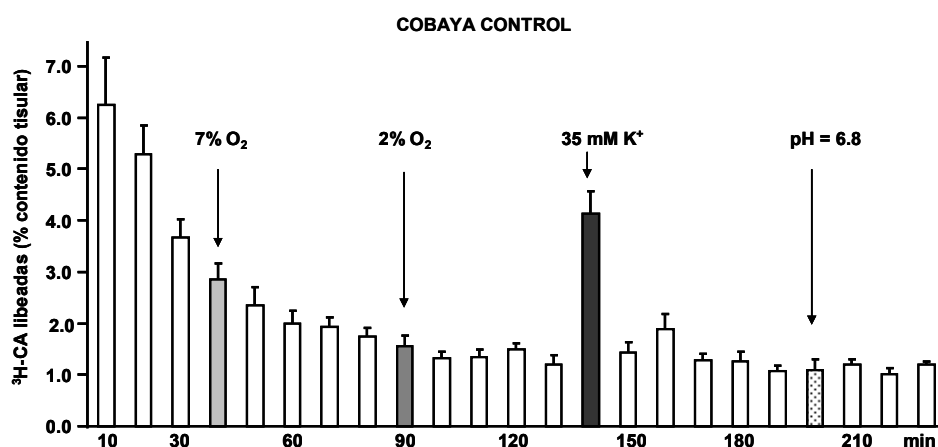
Los datos son medias ± SEM del número de ganglios cervicales superiores (GCS) que se muestra en cada columna. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 vs. valores normóxicos correspondientes.

En su conjunto estos datos de contenido y síntesis lo que nos indican es que en normoxia el CC de cobaya tiene 10 veces menos DA que el de rata y la utiliza en un tiempo que es casi doble que en la rata, o lo que es lo mismo, el CC de cobaya utiliza en torno a 1/20 la cantidad de DA por unidad de tiempo que el CC de rata. Además, el CC de cobaya que tiene en torno a 1/6 de NE que el de rata, lo utiliza en un tiempo casi 1/7 del utilizado por la rata, o lo que es lo mismo, por unidad de tiempo el CC de cobaya utiliza ligeramente más NE que el de rata. Esta mayor utilización de NE en el CC de cobaya correspondería en realidad a NE contenida en terminaciones simpáticas intraglómicas. En

hipoxia crónica el CC de cobaya contiene en torno a 1/11 de la cantidad de DA que el de rata y lo utiliza en un tiempo que es casi igual al tiempo de la rata, con lo que en hipoxia crónica el CC de cobaya utiliza una cantidad de DA que es próxima a 1/10-1/12 la cantidad usada por la rata. En hipoxia crónica el CC de cobaya contiene 1/15 la cantidad de NE que el de rata y lo utiliza en un tiempo que es 1/15 menor en el que lo usa la rata, por lo que las dos especies utilizan casi la misma cantidad de NE.

### 3.2. Liberación de $^3\text{H}$ -CA inducida por diversos estímulos en el CC de cobaya y rata.

La figura 9R muestra el protocolo general de los experimentos de liberación de  $^3\text{H}$ -CA. Tras marcar los depósitos de CA incubando los CC con  $^3\text{H}$ -tirosina de alta actividad específica, se procedió a incubar los CCs en medios normóxicos equilibrados con 20%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ , resto  $\text{N}_2$  y libre de precursor. Tras 1 h de incubación en este medio que se renovó cada 20 min. se procedió a recolectar estos medios cada 10 min. y a variar su composición según muestra cada figura. Los medios fueron posteriormente analizados para medir su contenido en  $^3\text{H}$ -CA.



**Figura 9R.** Protocolo general de los experimentos de liberación de  $^3\text{H}$ -CA en el CC de cobaya. Las barras vacías corresponden a incubación con solución control normóxica y las llenas según se indica. Los datos son medias  $\pm$ SEM de 8 CC.

Resulta evidente que ni la hipoxia moderada (7%  $\text{O}_2$ ) ni la intensa (2%  $\text{O}_2$ ), ni el ácido (pH = 6.8) modificaron el curso temporal espontáneo de la liberación de  $^3\text{H}$ -CA en el CC de cobaya, mientras que el alto  $\text{K}^+$  aumentó la liberación por un factor de  $\geq 3$  veces. La figura 10R muestra de forma comparativa experimentos en CC de cobaya y rata. La liberación inducida por hipoxia está ausente en cobaya mientras que en rata es evidente. Por el contrario el alto  $\text{K}^+$  produce una liberación que es comparable en las dos especies.

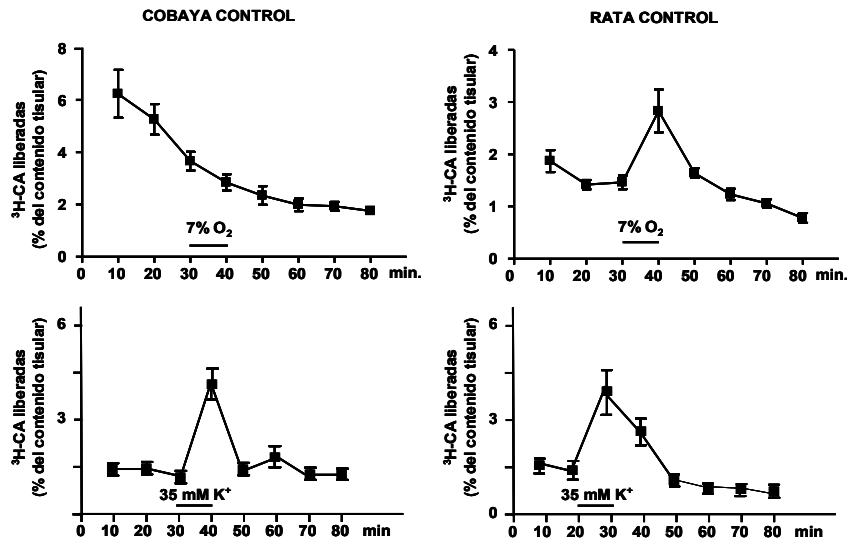


Figura 10R. Comparación de la liberación en cobaya y rata. Medias  $\pm$ SEM de 8 ó más datos.

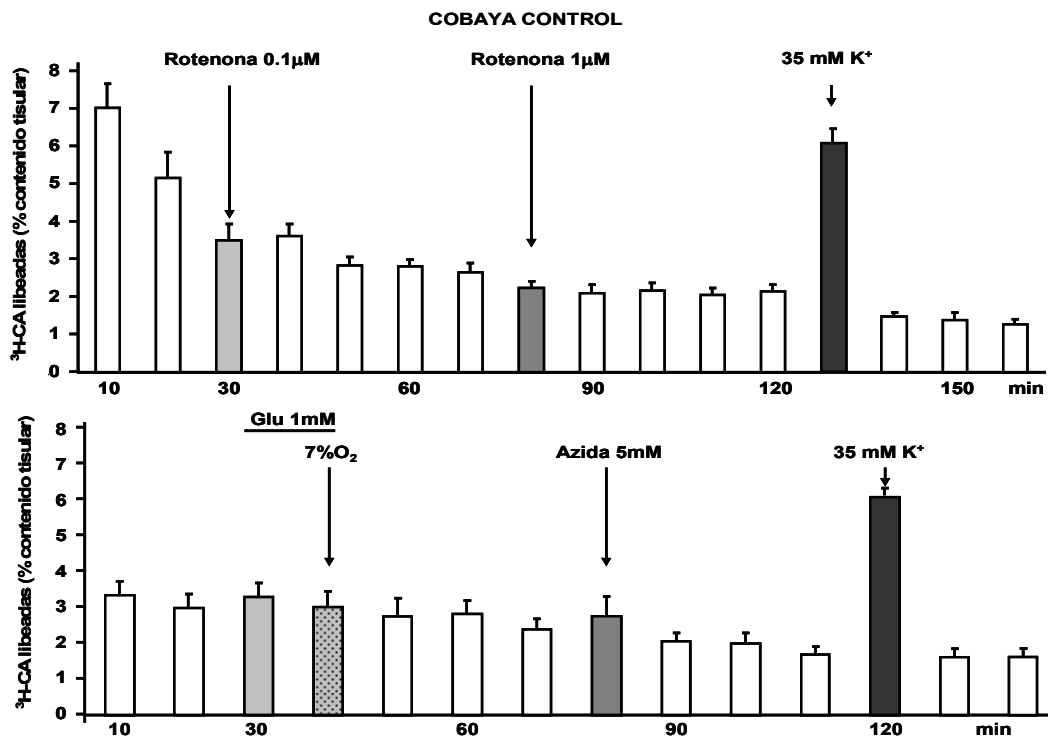
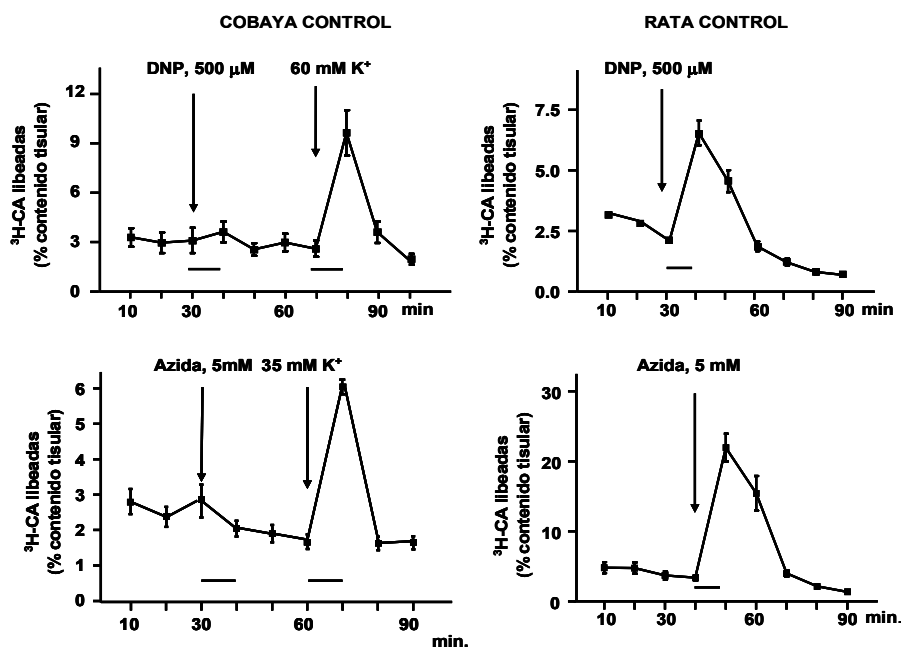


Figura 11R. Efectos de la rotenona (0.1 y 1  $\mu$ M), la azida sódica (5 mM) la hipoxia moderada + baja glucosa y alto K<sup>+</sup> sobre la liberación de <sup>3</sup>H-CA en cobaya. Ni los venenos ni la hipoxia+baja glucosa activaron la liberación en el CC de cobaya. Los datos son medias  $\pm$ SEM de 6 ó más datos individuales.

La Figura 11R muestra los efectos de rotenona (un inhibidor de la cadena respiratoria a nivel del Complejo 1) a 0.1 y 1  $\mu$ M, azida sódica (un inhibidor de la citocromo oxidasa; 5 mM), hipoxia moderada en un medio pobre en glucosa y alto K<sup>+</sup>

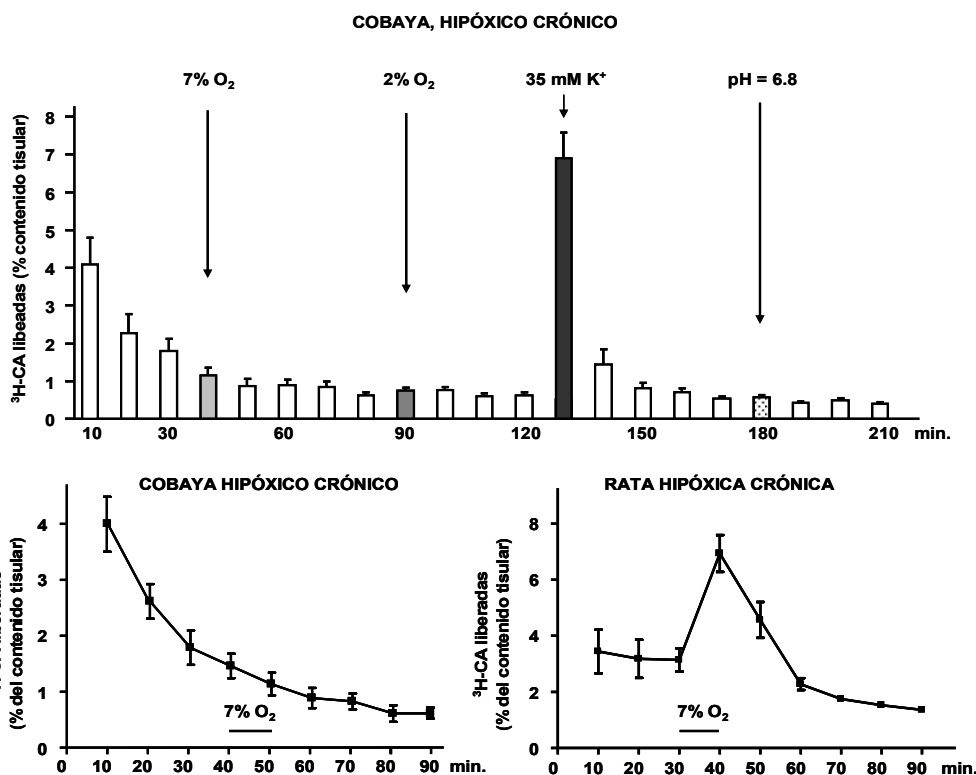
sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -CA en el CC de cobaya. Ni los venenos mitocondriales ni la hipoxia+baja glucosa activaron la liberación en el CC de cobaya.

La 12R muestra experimentos comparativos en cobaya y rata en los que se explora el efecto del dinitrofenol (DNP), un protonóforo clásico, la azida y el alto  $\text{K}^+$ . Tampoco el DNP activó la liberación de  $^3\text{H}$ -CA en el CC de cobaya, mientras que en la rata produjo una respuesta intensa. La azida que en el cobaya apenas modificó la liberación en rata casi vacía los CC de  $^3\text{H}$ -CA recién sintetizadas.



**Figura 12R.** Efectos del DNP ( $500\ \mu\text{M}$ ), la azida ( $5\ \text{mM}$ ) y el alto  $\text{K}^+$  sobre la liberación de  $^3\text{H}$ -CA en el CC de cobaya y rata. Los venenos mitocondriales no activaron la liberación en el CC de cobaya pero sí en el de rata. El alto  $\text{K}^+$  fue efectivo en ambas especies.

La Figura 13R muestra experimentos en CC de cobaya y rata crónicamente hipóxicos. Como puede observarse, aún cuando la hipoxia crónica aumentó la síntesis de  $^3\text{H}$ -CA ( $^3\text{H}$ -NE +  $^3\text{H}$ -DA) por un factor de en torno a 3 y reactivó la maquinaria secretora para la liberación inducida por el alto  $\text{K}^+$  (compárese con la Figura 11R, ver Tabla VR), no fue capaz de reactivar o producir un acoplamiento estímulo secreción entre la hipoxia y la liberación de CA en las CQ. En rata, al contrario, la respuesta inducida por la hipoxia es más intensa que en los CC normóxicos (compárese con la Figura 10R). La Tabla VR resume los datos de liberación en ambas especies controles y crónicamente hipóxicos. Lo más llamativo es la ausencia de repuestas a los estímulos fisiológicos y a los venenos mitocondriales y la respuesta normal, comparativamente con la rata al alto  $\text{K}^+$ .



**Figura 13R.** Liberación de <sup>3</sup>H-CA por el CC de cobayas hipóxicos crónicos (parte superior) y comparativo entre cobaya y rata (parte inferior).

**Tabla VR.** Resumen del efecto de diversos estímulos sobre la liberación de <sup>3</sup>H-CA por el CC.

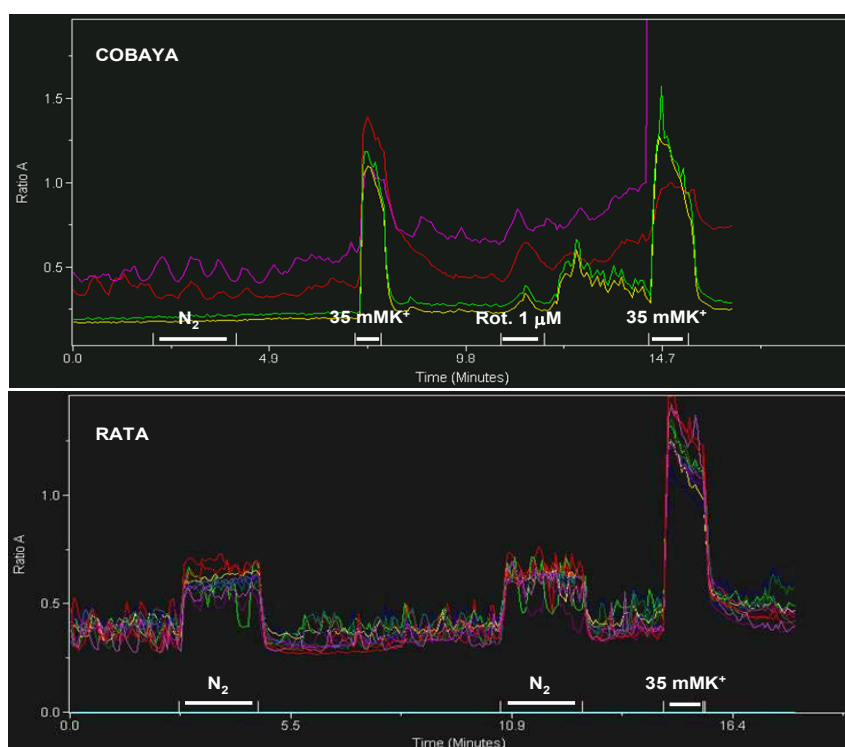
Estímulo	Liberación evocada de CA por el cuerpo carotídeo (veces sobre la basal)			
	Cobaya		Rata	
	Control	H. Crónica	Control	H. Crónica
Hipoxia moderada (7% O <sub>2</sub> )	0 (n = 12)	0 (n = 8)	3.2 ± 0.3 (n = 18)	7.1 ± 0.6*** (n = 8)
Hipoxia intensa (2% O <sub>2</sub> )	0 (n = 12)	0.2 ± 0.2 (n = 12)	10.1 ± 1.3 (n = 12)	17.2 ± 1.6*** (n = 8)
E. Ácido (pH = 6.8)	0 (n = 12)	0 (n = 8)	0.3 ± 0.1 (n = 12)	---
35 mM K <sup>+</sup>	3.3 ± 0.2 (n = 30)	7.2 ± 0.9*** (n = 12)	4.2 ± 0.6 (n = 6)	14.7 ± 1.3*** (n = 8)
60 mM K <sup>+</sup>	8.2 ± 0.9 (n = 6)	---	8.8 ± 1.1 (n = 6)	---
Azida (5 mM)	0 (n = 6)	---	15.6 ± 1.9 (n = 8)	---
DNP (500 μM)	0 (n = 6)	---	6.2 ± 0.8 (n = 8)	---
Rotenon (0.1 μM)	0 (n = 6)	---	5.7 ± 0.8 (n = 8)	---
Rotenona (1 μM)	0 (n = 6)	---	20.8 ± 1.7 (n = 8)	---
Glucosa (1 mM)	0 (n = 6)	---	0 (n = 16)	---

\*La comparación se ha hecho entre animales controles e hipóxicos crónicos, por lo que diferencias significativas implican sensibilización o desensibilización de las respuestas. \*\*\*p<0.001.



#### 4. Cuantificar las modificaciones de los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular inducidas por la hipoxia en las CQ de cobaya aisladas.

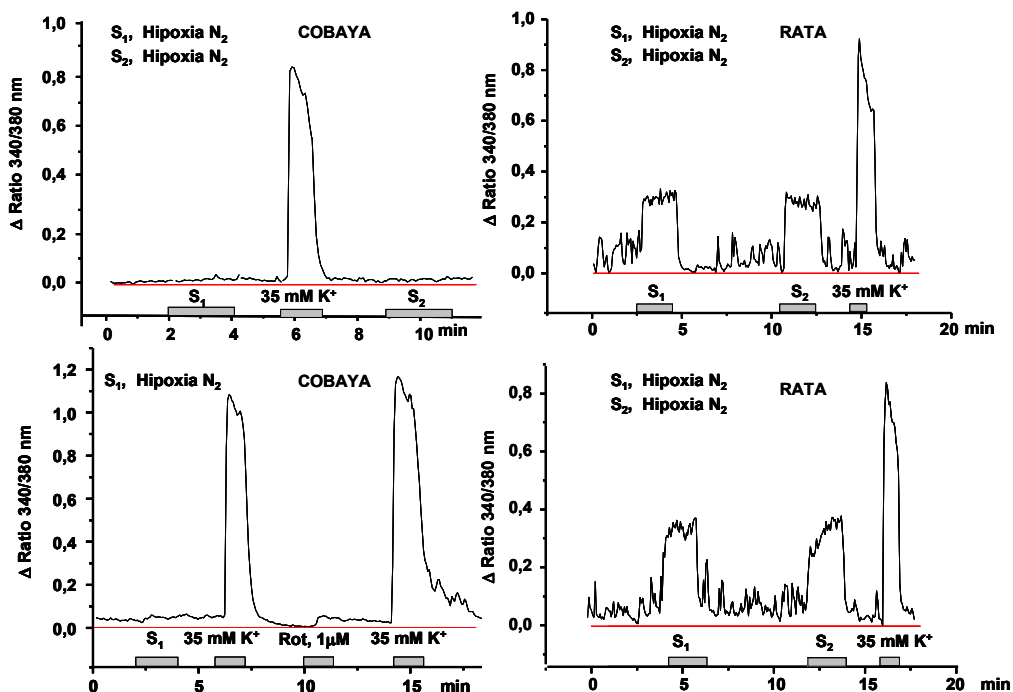
Con los experimentos que vamos a describir en esta sección intentamos ir acercándonos de forma progresiva a la maquinaria de transducción del estímulo hipóxico. Si en respuesta a la hipoxia las CQ se despolarizaran, deberían activar canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje, según indican los experimentos de liberación con alto  $\text{K}^+$ , y promover aumentos del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Según decíamos al presentar los objetivos, estos experimentos intentan explorar la posibilidad de que aún cuando no existiera un paralelismo entre la liberación de CA y ventilación, tal vez pudiera deberse a que fuera algún otro neurotransmisor el que acoplara las CQ a las terminaciones sensoriales del nervio del seno. En tal caso, la hipoxia debería promover un aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  en las CQ que habría de poner en marcha la liberación regulada del neurotransmisor alternativo.



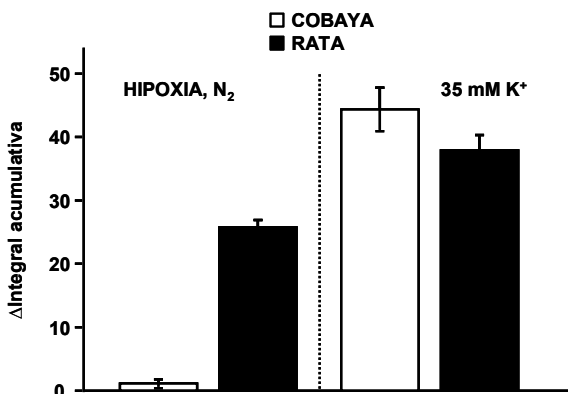
**Figura 14R.** Relaciones de fluorescencias emitidas a 340 y 380 nm por CQ de cobaya y de rata presentes en un campo del microscopio en respuesta a distintos estímulos.

La Figura 14R muestra registros “crudos” de las relaciones de fluorescencias emitidas a 340 y 380 nm por CQ de cobaya y rata en respuesta a distintos estímulos. Lo primero que llama la atención es que en los campos microscópicos de los cultivos de cobaya el número de células redondeadas-ovales con tamaño y birrefringencia compatibles con el de CQ y que además se despolarizaran en respuesta a alto  $\text{K}^+$  (4

células en este caso) era muy inferior al que se obtenía en los cultivos de rata (12 células en este caso concreto; ver también Figuras 2, 3 y 4). Resulta evidente que la hipoxia, perfusión con soluciones equilibradas con 95% N<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub> (PO<sub>2</sub> en el baño de 15 a 18 mmHg), no produjo ninguna modificación en la proporción 340/380 nm en las células de cobaya, que el alto K<sup>+</sup> la aumentó de forma marcada y que 1 μM de rotenona produjo un cambio muy pequeño. En cambio, en las células de rata, la hipoxia produjo un cambio en las emisiones que fue próximo a la mitad del producido por alto K<sup>+</sup>, que a su vez es comparable al obtenido en células de cobaya. La Figura 15R muestra el procedimiento de análisis de la fluorescencia a 340/380 nm (ver pie de figura) para poder cuantificar las señales registradas. La Figura 16R muestra dicha cuantificación.



**Figura 15R.** Se presentan registros de dos células de cobaya y dos de rata para mostrar el procedimiento de análisis de las señales de fluorescencia. Las señales se desplazan electrónicamente a cero y luego el software integra el área bajo la curva en función del tiempo, pudiendo medir el incremento del área a distintos tiempos y durante distintos periodos de tiempo.



**Figura 16R.** Integral acumulada durante la estimulación hipóxica y con alto K<sup>+</sup> en CQ de cobaya y rata. Los datos son medias ± SEM de 16 células de cobaya y 29 de rata.

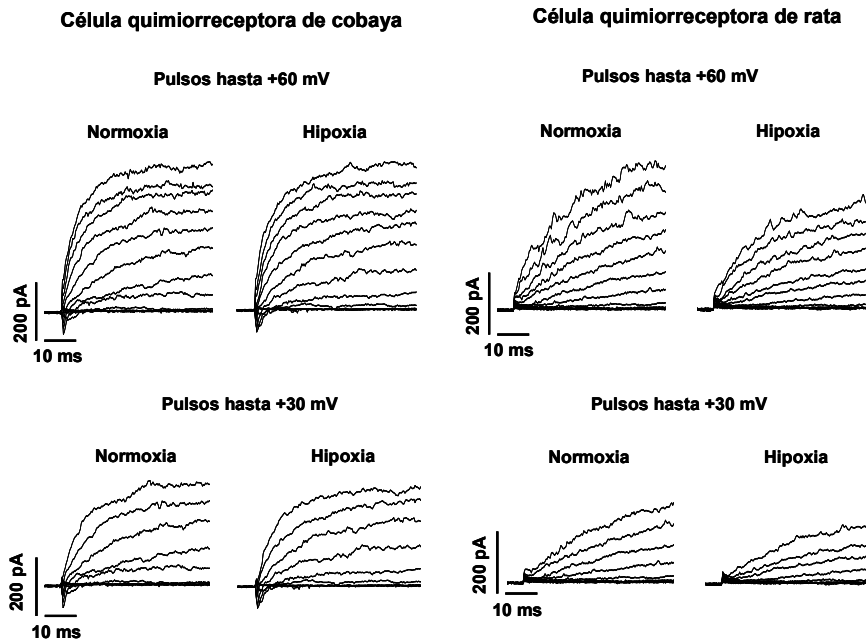
Según puede observarse, la hipoxia en cobaya no modificó el curso temporal de la señal de fluorescencia acumulada mientras que el alto  $K^+$ , que fue aplicado durante la mitad de tiempo (1 min.) que la hipoxia (2 min.) produjo un aumento en las células de cobaya de 44 unidades arbitrarias, ligeramente mayor que en la rata que fue de 38 unidades. En la rata, la hipoxia produjo un aumento de la fluorescencia de 26 unidades arbitrarias. Curiosamente, la liberación inducida por 35 mM de  $K^+$  en el cobaya fue ligeramente menor que en la rata (ver Tabla VR) lo que sugeriría menor sensibilidad al  $Ca^{2+}$  de la maquinaria excitotóxica en el cobaya que en la rata.

### **5. Verificar la existencia de corrientes de $K^+$ sensibles a la hipoxia en las CQ del cobaya.**

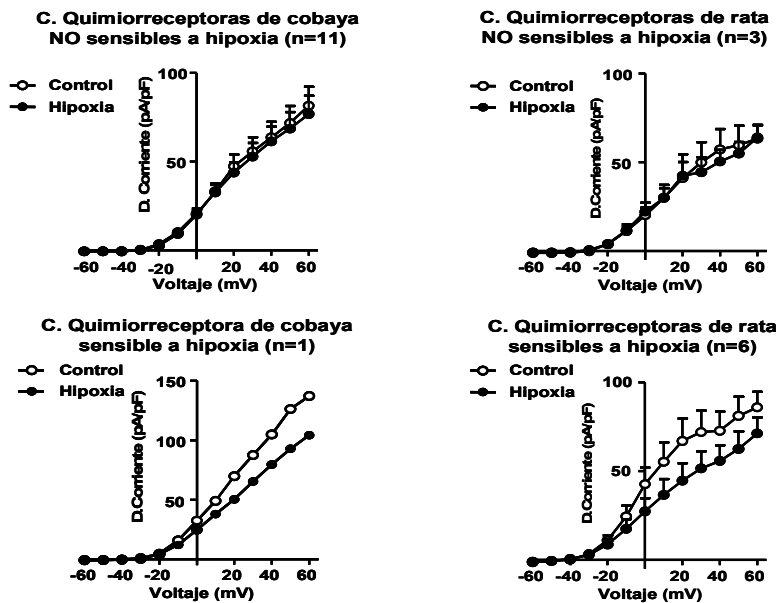
Ahondando en los mecanismos de transducción del estímulo hipóxico nos acercamos a los canales de  $K^+$  sensibles a la hipoxia y su inhibición por la disminución de la  $PO_2$ , que, según escribíamos en los objetivos, constituyen el primer efector (los propios canales; su inhibición sería el primer efecto) de la respuesta a la hipoxia en las CQ (López Barneo et al., 1988; López-López et al., 1989). La pregunta es ¿poseen las CQ de cobaya este primer elemento efector de la cascada de transducción de la hipoxia?

La Figura 17R muestra familias de corrientes de  $K^+$  obtenidas por pulsos despolarizantes de -60 a +60 mV en una CQ de cobaya y en otra de rata en condiciones de normoxia y de hipoxia. Como se puede ver en la figura, las dos familias de curvas, la obtenida en normoxia y la obtenida en hipoxia, son superponibles indicando que la hipoxia no ha modificado la cantidad de corriente que fluye a través de la membrana a ninguno de los potenciales. Restringiendo los registros a un rango de potenciales de membrana más fisiológico, hasta +30 mV, tampoco se aprecia ninguna diferencia. Por el contrario, en la CQ de rata tanto en la familia de curvas hasta +60 como en la familia de curvas hasta +30 es evidente que la hipoxia inhibe el flujo de  $K^+$  a todos los potenciales registrados. Parece pues que las CQ de cobaya no poseen componentes en sus corrientes de  $K^+$  sensibles a la hipoxia, mientras que si están presentes en rata (ver López-López et al., 1997).

La Figura 18R muestra curvas I/V para las corrientes de  $K^+$  obtenidas en 12 CQ de cobaya y en 9 CQ de rata. En el cobaya de las 12 células registradas 11 no respondieron a la hipoxia y las curvas I/V son básicamente superponibles en normoxia e hipoxia en todo el rango de potenciales de membrana. Una de las células registradas respondió a la hipoxia con una inhibición de las corrientes de  $K^+$  a +60 mV de  $\approx 25\%$ .



**Figura 17R.** La parte superior de la figura muestra una familia de corrientes de  $K^+$  obtenida en una célula de cobaya y en una de rata por pulsos despolarizantes desde  $-60$  a  $+60$  mV en incrementos de  $10$  mV en normoxia (superfusión con solución equilibrada con aire,  $PO_2 \approx 150$  mmHg), e hipoxia, (superfusión equilibrada con  $N_2$  que en la camarita de registro da una  $PO_2$  de  $15$  a  $20$  mmHg). La parte inferior muestra familias de curvas entre  $-60$  y  $+30$  mV.



**Figura 18R.** Curvas I/V para las corrientes de  $K^+$  obtenidas en  $12$  CQ de cobaya y en  $9$  de células de rata. Se representan medias  $\pm$ SEM de  $n$  células según indica la figura.

Puede apreciarse también en la Figura 18R que las curvas I/V son esencialmente lineales desde  $-20$  a  $+60$  mV sugiriendo que el componente de corrientes activado por  $Ca^{2+}$  es muy pequeño ya que como puede verse en las células de rata, a pesar de la presencia de EGTA en la pipeta, las curvas I/V tienen la joroba típica del componente  $Ca^{2+}$  dependiente entre  $0$  y  $+40$  mV (Peers, 1990; López-López et al., 1997). En la rata de las

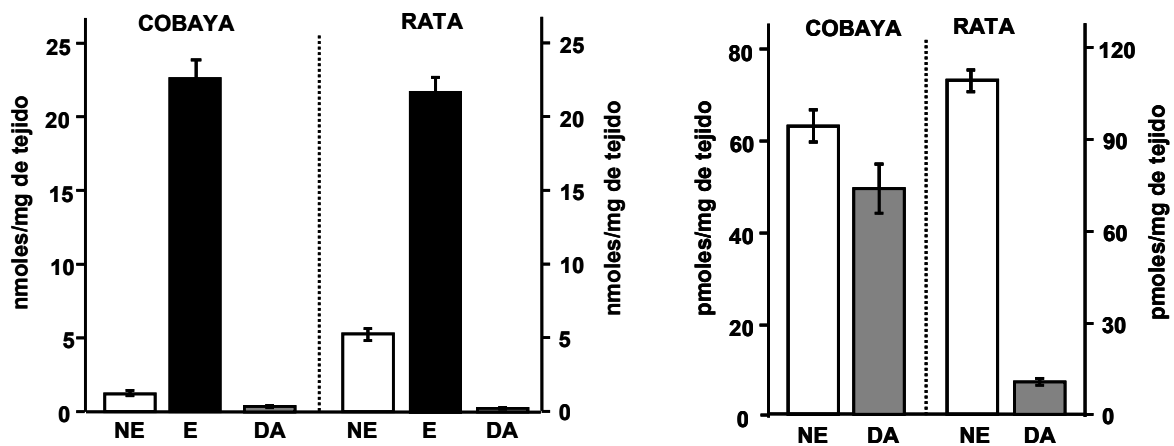
9 células registradas 6 expresaban componentes en sus corrientes de  $K^+$  sensibles a la hipoxia, y, como puede observarse por el aplanamiento de la curva I/V, el componente mayoritario sensible a la hipoxia es  $Ca^{2+}$  dependiente. En esta serie, con un número reducido de células de rata registradas, han sido sensibles a la hipoxia el 67%; en la serie de López-López et al. (1997) con más de 30 células el porcentaje fue del 79%. Finalmente otro aspecto que se evidencia en las curvas I/V es que la densidad de corriente de  $K^+$  en células de rata y de cobaya es aproximadamente igual excepto en la célula de cobaya sensible a la hipoxia que tiene mayor densidad de corriente que la media del resto de las células en ambas especies.

### **6. Analizar los efectos de la hipoxia sobre la presión arterial, glucemia, lactacidemia y niveles de CA plasmáticas y la posible sensibilidad directa de las células cromafines de la MA a la hipoxia.**

En los animales recién nacidos, que carecen de actividad quimiorreceptora porque el CC aún no está innervado, la MA se activa intensamente en respuesta a la hipoxia, dando como resultado un aumento muy marcado de epinefrina (E) y NE en plasma y en todo el medio interno, que luchan contra la hipoxia activando distintas rutas metabólicas. Además, esta respuesta de la MA se debe a que sus células cromafines son directamente sensibles a la hipoxia. Dado que el cobaya adulto no hiperventila en respuesta a la hipoxia, ¿conservan sus células cromafines la sensibilidad a la hipoxia que muestran los animales neonatos? Los experimentos que siguen han ido encaminados a responder esta pregunta.

La Figura 19R muestra el contenido de CA de la MA y del GCS de cobaya y rata. La médula de cobaya contiene  $1.48 \pm 0.14$  nmoles de NE/mg de tejido ( $n=10$ ) y la de rata casi 4 veces más ( $5.23 \pm 0.45$  nmoles/mg de tejido;  $n=10$ ). Sin embargo la E está en concentraciones similares en la médula de ambas especies  $22.2 \pm 2.50$  nmoles/mg de tejido en cobaya y  $21.5 \pm 1.5$  nmoles/mg de tejido en rata. La DA, que es una catecolamina minoritaria en MA también está menos concentrada en cobaya que en rata,  $0.15 \pm 0.02$  vs.  $0.22 \pm 0.03$  nmoles/mg de tejido, respectivamente. La relación E/NE en cobaya es de 15.0 y en la rata de 4.2, lo que sugiere un mayor papel potencial de la MA de cobaya en el control del metabolismo, mientras que en la rata el papel de la MA en el control de la función vascular sería potencialmente más intenso (Brewster et al., 1956; Goldstein et al., 2003). En GCS los niveles de NE en cobaya fueron en torno a la mitad que en rata ( $62.4 \pm 4.5$  vs.  $107.3 \pm 4.56$  pmoles/mg tejido), mientras que la de DA fue 6 veces mayor en cobaya que en rata ( $48.8 \pm 6.1$  vs.  $8.3 \pm 1.89$  pmoles/mg tejido) con lo

que la proporción DA/NE fue mucho mayor en el cobaya que en la rata (0.78 vs. 0.18). Dado que la DA en el ganglio cervical superior estaría almacenada en las células SIF (Small Intensely Fluorescent), que actúan como interneuronas inhibitorias usando DA como neurotransmisor (Libet y Owman, 1974), podría sugerirse que la actividad simpática está más fuertemente modulada en cobaya que en rata.

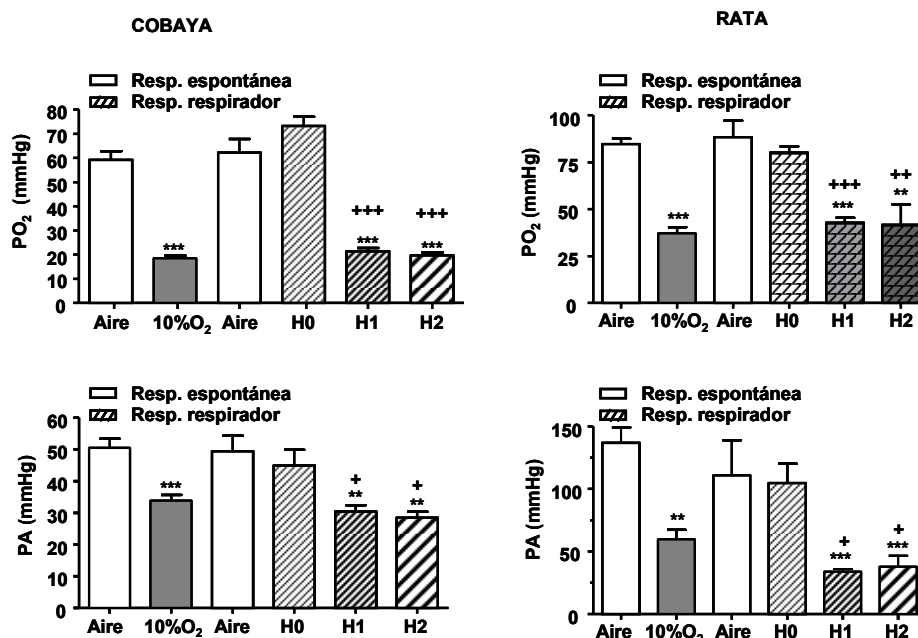


**Figura 19R.** Niveles de CA en la medula adrenal (izquierda) y ganglio cervical superior (derecha) de cobaya y rata. Los datos son medias  $\pm$  SEM de 14 datos en el cobaya y 10 en la rata.

En la Figura 20R se muestra el protocolo de exposición a la hipoxia junto con los niveles de  $PO_2$  y PA en cobaya y en rata. Como puede verse en ambas especies se aplicó un periodo de hipoxia de 10 min. (respiración de 10%  $O_2$  en  $N_2$ ) en el que los animales respiraban de forma espontánea, al final del cual se tomaban muestras de sangre para análisis. Los animales volvían a respirar aire durante 10-15 min. para que se recuperaran, y al finalizar este periodo, se tomaban nuevas muestras de sangre para análisis. A continuación se iniciaba una ventilación con mezcla hipóxica durante 30 min. asistida con respirador y se tomaban muestras de sangre para análisis cada 10 min. La PA se medía de forma continua.

Los perfiles de las  $PO_2$  arteriales son comparables en ambas especies, pero en cualquier condición la  $PO_2$  fue más baja en cobaya ( $59 \pm 3.7$  mmHg en la primera muestra en aire) que en rata ( $84 \pm 3.0$  mmHg). Este hecho que pareció extraño ha sido observado previamente (Feuerstein et al., 1985) y no se sabe la razón ni el significado exacto ya que la  $PCO_2$  es comparable en ambas especies (Feuerstein et al., 1985). Lo mismo es cierto con la PA (Figura 20R paneles inferiores): el cobaya es un animal hipotenso ( $50 \pm 2.9$  mmHg) en comparación la rata ( $136 \pm 12.5$  mmHg) y la hipoxia produce una caída de la

PA en cobaya de 17 mmHg, mucho menos intensa que en la rata (76 mmHg) (ver Bernareggi et al., 1999; Xu et al., 2003). Porcentualmente la disminución de la PA en cobaya es del 34% y en la rata del 56%. Estas diferencias podrían reflejar una menor sensibilidad de los vasos periféricos a la hipoxia.

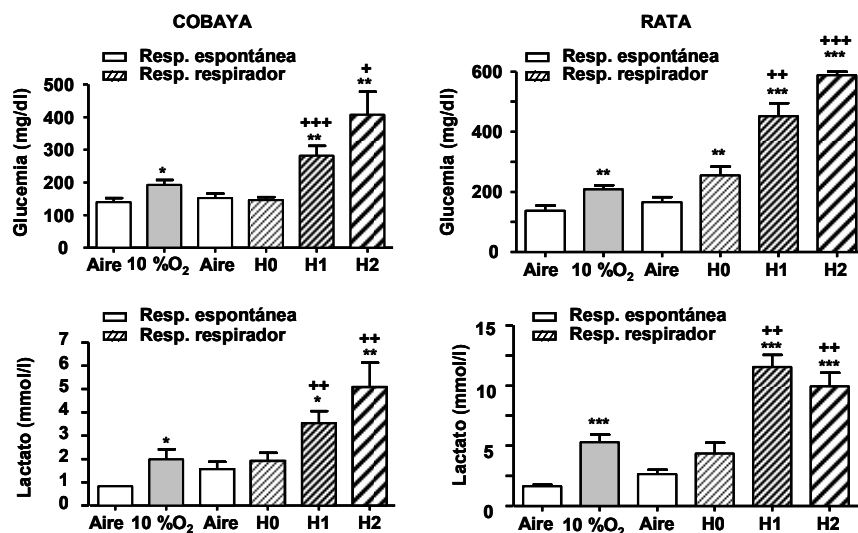


**Figura 20R.** Protocolos de exposición aguda a la hipoxia (respiración 10% O<sub>2</sub>) y niveles de PO<sub>2</sub> y presión arterial (PA) obtenida en cobayas y ratas. Los datos son medias  $\pm$  SEM de 9 datos individuales, aunque lo que se indica en la Figura como H2 (tercer periodo de hipoxia, del minuto 20 al 30 con respiración asistida, en rata sólo hay tres datos porque no resistían los 30 minutos de hipoxia). \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001 vs. primera toma respirando aire. +p<0.05, ++p<0.01; +++p<0.001 vs. H0.

En las muestras de sangre obtenidas siguiendo el protocolo anterior también se midieron la glucemia y los niveles de lactato en plasma (Figura 21R). Como puede verse en la Figura 21R, los niveles de glucosa en plasma en ambas especies fueron en torno a 135 mg/100ml de plasma. Estos experimentos se realizaron por la tarde tras haber mantenido en ayunas a los animales desde la 9 de la mañana hasta las 3-7 de la tarde. Tal vez ésta sea la causa de que los valores de glucemia en la primera toma sean más altos de lo que habitualmente obtenemos en nuestro laboratorio cuando los animales ayunan toda la noche.

En ambas especies la hipoxia produjo aumentos marcados de glucemia con un patrón comparable, pero las glucemias más altas se alcanzaron en la rata, en las que al final del tercer episodio de hipoxia con respirador las glucemias llegaron a  $587 \pm 11$  mg/100 ml, mientras que en el cobaya sólo alcanzaron  $407 \pm 70$  mg/100 ml. Los niveles

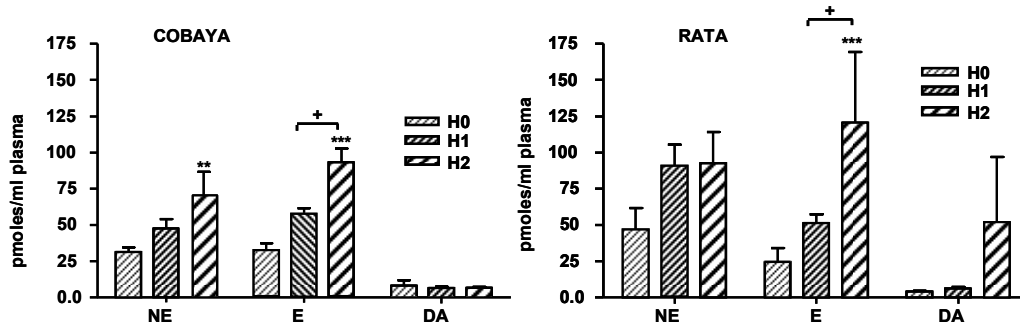
de ácido láctico en cobaya y rata en la primera muestra respirando aire fueron de  $0.82 \pm 0.04$  y  $1.63 \pm 0.16$  mmole/litro, valores estos últimos comparables a los encontrados por Lin et al. (2013). La hipoxia aumentó el lactato en sangre para alcanzar un valor de 5 a 6 veces más alto en el tercer episodio de hipoxia (H2).



**Figura 21R.** Niveles de glucosa y lactato en plasma en cobaya y rata en condiciones de normoxia e hipoxia según muestra la Figura. Los datos son medias  $\pm$  SEM de 9 datos individuales, aunque en lo que se marca en la Figura como H2 (tercer periodo de hipoxia, del minuto 20 al 30, con respiración asistida en rata sólo hay tres datos porque no resistían los 30 min. de hipoxia. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs. primera toma respirando aire. + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$ ; +++ $p < 0.001$  vs. H0.

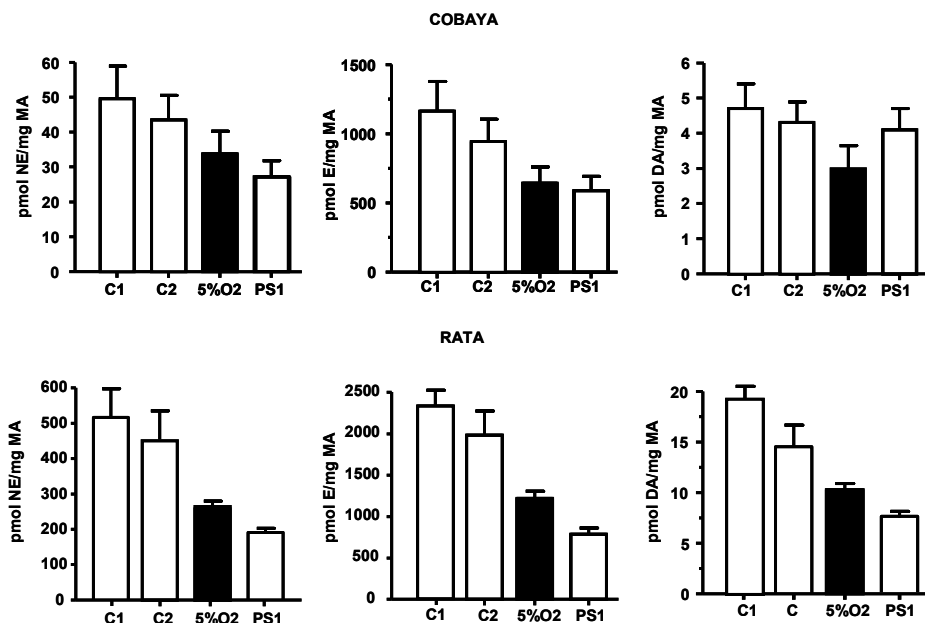
En las muestras de sangre obtenidas en las tres hipoxias con respiración asistida se determinaron CA en plasma. Los datos se presentan en la Figura 22R. La inspección de las gráficas (Figura 22R) indica que los patrones de respuesta son comparables. El único aspecto a señalar es que los niveles de NE en cobaya en las tres hipoxias son menores que en la rata, lo que probablemente refleje el menor efecto hipotensor de la hipoxia en esta especie (Figura 20R), y por tanto una menor activación compensatoria del simpático. La génesis de la respuesta a la hipoxia que aumenta los niveles de CA obedecería, en principio, a una activación del simpático mediada por el reflejo barorreceptor: la vasodilatación generalizada que produce la hipoxia de forma directa genera una hipotensión (Figura 20R) que silencia a los barorreceptores aórticos y carotídeos y una desinhibición del simpático con lo que aumenta su actividad encaminada a vencer la hipotensión. No parece, pues, que haya ninguna sensibilidad especial de la MA a la hipoxia, ni por la cantidad de CA que se generan (Figura 22R) ni por las modificaciones en la glucemia y lactacidemia (Figura 21R).





**Figura 22R.** Niveles de CA en plasma de cobaya y rata medidas al final de cada uno de los tres periodos de hipoxia aplicada con respirador. Los datos son medias  $\pm$  SEM de 9 datos individuales excepto en el tercer periodo de hipoxia en la rata en la sólo 3 de los 9 animales lo toleraron.

En un último intento de búsqueda de la posible sensibilidad de la MA a la hipoxia, se realizó un grupo de experimentos *in vitro* en los que se midió el efecto directo de la hipoxia sobre la secreción de CA (Figura 23R). Lo más relevante de los datos de esta figura es que la hipoxia aplicada *in vitro* no aumenta la liberación de CA de la MA en ninguna de las dos especies. Según puede apreciarse en la Figura 19R la relación E/NE en la MA de cobaya es de 15.0 mientras que en el medio de incubación en condiciones controles (C1) es de 23.5 ( $1164 \pm 216$  pmole/mg tejido de E y  $49.6 \pm 9.3$  pmole/mg tejido de NE) lo que sugiere que un turnover de E sería más rápido que el de NE. En la rata, la proporción de E/NE en el tejido adrenomedular es de 4.2 y en la muestra C1 es de 4.4, esto es, casi idéntica ( $2220 \pm 201$  pmole/mg tejido de E y  $510 \pm 83$  pmole/mg tejido de NE) lo que sugiere una velocidad de turnover comparable para ambas CA.



**Figura 23R.** Curso temporal de la liberación de CA por la MA de cobaya y rata. Efectos de la hipoxia. Los datos son medias  $\pm$  SEM de 10 datos individuales en cobaya y 8 en la rata.

Las consideraciones hechas a propósito de los datos obtenidos *in vitro* con el de los contenidos medulares es obvio que no se mantienen cuando se miden las CA en plasma, donde E y NE están en concentraciones comparables, de hecho en plasma de rata la NE esté a concentraciones ligeramente superiores que la E. La razón es que *in vivo* la principal fuente de NE son las terminaciones simpáticas, estimándose que esta fuente de NE puede representar el 80% o más de la NE circulante (Goldstein et al., 2003).

## **DISCUSIÓN**



Siguiendo la organización del trabajo en base a los objetivos, vamos a discutir nuestros hallazgos más relevantes y su interpretación, todo ello presidido por una pregunta, ¿cómo se defiende el cobaya ante un episodio de hipoxia aguda?

### **1. Aspectos morfológicos e inmunocitoquímicos.**

Cuando se examina a nivel macroscópico el CC de cobaya y se compara con el de rata, ya sea *in situ* o tras disección completa *in vitro*, no hay nada que llame la atención. El tamaño es similar y la inervación *in situ* está perfectamente definida. Sin embargo, cuando se pesan los CC las diferencias comienzan a ser evidentes. González en su Tesis Doctoral (1977) utilizando una muestra amplia de CC de rata, conejo y gato encuentra que hay una relación peso del CC/peso corporal que es muy parecida en las tres especies. Cabría esperar que el peso del CC en cobaya fuera aproximadamente 2.5-3 veces mayor que el de rata (en el conejo el CC es unas 6 veces mayor que en la rata). Por tanto, podemos afirmar que el CC en el cobaya es hipotrófico. Es cuando menos curioso que en la serie de CC humanos de Lack (1978) de 32 pacientes, la media de peso de los 2 CB fue de 25 mg, esto es 12.5 mg/CC. La media de peso de sus sujetos fue de 64 Kg., o lo que es lo mismo aproximadamente 0.19 mg. de CC/Kg. de peso; en nuestras ratas son 0.050mg/≈0.3 Kg. ó lo que es lo mismo 0.17mg/Kg. Sin embargo en la serie Ortega-Sáez et al. (2013) los CC humanos fueron mayores. Obviamente, según se ha señalado ya, la disección de tejidos circundantes puede definir el tamaño del CC y su contenido en NE.

Pero más llamativo aún es la falta de respuesta a la hipoxia sostenida. Mientras que en la rata el peso del CC se duplica o más tras 15 días de exposición a hipoxia, en el cobaya el peso del CC no se modifica. La respuesta en la rata es comúnmente observada en otros mamíferos desde el ratón al hombre pasando por la ternera (Lack, 1978; Heath y Smith, 1992; Wang y Bisgard, 2002). En pacientes que mueren con enfermedades hipoxemizantes los CC están hipertróficos en comparación con los controles (Heath y Smith, 1992). La hipertrofia del CC se debe fundamentalmente a un aumento del componente vascular del CC (Laidler y Kay, 1975; Del Rio et al., 2011) habiendo sido atribuido este aumento a la producción de VEGF por las células quimiorreceptoras (Wang y Bisgard, 2002; Tipoe y Fung, 2003). Además, la hipoxia sostenida produce según algunos autores hipertrofia de las células quimiorreceptoras y según otros hiperplasia o ambas (Wang y Bisgard, 2002). El mecanismo o el mediador de estos cambios no se conoce, pero en un estudio *in vitro* de Stea et al. (1992) se observó que las células quimiorreceptoras en cultivo en ambiente hipóxico aumentaban de tamaño y que análogos no hidrolizables del AMPc mimetizaban a la hipoxia. Cabe pues sugerir que, dado que la

hipoxia aumenta el AMPc en el CC (Pérez-García et al., 1990), tal vez sería éste el mediador de la hipertrofia (ver Berdeaux y Stewart, 2012) y tal vez también el de la hiperplasia (Stratakis, 2009). Por tanto, se podría predecir que en cobaya la hipoxia no aumenta el VEGF ni el AMPc en las células quimiorreceptoras. En este contexto hay que mencionar que ratas perinatalmente expuestas a hiperoxia poseen CC hipotróficos y que en ellos la hipoxia no aumenta el AMPc (Prieto Lloret et al., 2014).

Sin embargo, el hematocrito aumentó en ambas especies tras la exposición a hipoxia crónica. El aumento en cobaya, aunque significativo (+5%), fue menor que en la rata (+15%), pero pensamos que suficiente para indicar que el HIF-1 $\alpha$ , factor de transcripción controlador de la expresión del gen de la EPO durante la hipoxia (Semenza et al., 2006), es activo en cobaya. Hay que señalar que Blake y Blanchero (1985) en cobayas expuestas a una hipoxia calculada del 13% de O<sub>2</sub> (los animales son expuestos a 15% de O<sub>2</sub> en Colorado donde la PB es de 627 mmHg) encuentran que el hematocrito aumenta casi en un 20% tras 11-15 semanas de hipoxia, sugiriendo que este aumento sería comparable al que ocurre en la enfermedad de Monge; en estos pacientes la escasa respuesta ventilatoria a la hipoxia conduce a una eritrocitosis exagerada que a priori tendría un carácter compensatorio, pero que causa un aumento de la viscosidad de la sangre, que acaba generando un fallo cardiaco. Con nuestros hallazgos no compartimos la opinión de los autores de Colorado y pensamos que una eritrocitosis exagerada no sería una respuesta adecuada para un animal oriundo de las altas planicies andinas: la eritrocitosis exagerada en sus cobayas sería, como la enfermedad de Monge, una adaptopatía (Monge y León-Valverde, 1992). Hay que tener en cuenta que la EPO de cobaya es capaz de estimular a los progenitores eritroides del cobaya, pero no a los humanos o de ratón, que no forman colonias en respuesta a la EPO de cobaya (Stopka et al., 1998). Esta especificidad de especie en cobaya para la EPO-sistema eritropoyético constituye una excepción entre los mamíferos ya que en un gran número de especies no existe la mencionada especificidad de especie (Necas et al., 1976).

Los estudios inmunohistoquímicos e inmunocitoquímicos revelan una escasez de células positivas a tirosina hidroxilasa, tanto en cortes como en cultivos de CC de cobaya en comparación con el de rata. La cuantificación del área positiva a tirosina hidroxilasa en secciones es 20 veces menor en cobaya (1.1%) que en rata (casi 25%) y el número de células aisladas positivas al enzima limitante en la síntesis de CA es cuatro veces mayor en rata que en cobaya. Es llamativo que en ambas especies el tanto por ciento de células aisladas positivas al enzima excede por un factor de 10 en cobaya y por un factor de

aproximadamente 2 en la rata a las correspondientes áreas tirosina hidroxilasa positivas en las secciones. Pensamos que el mayor determinante de esta diferencia sería la presencia de tejido conectivo, cuya celularidad sería muy baja, y que sería escaso en la rata y mayor en el cobaya. En otras palabras, siguiendo a De Castro (1940), el CC de rata habría que clasificarlo como compacto-intermedio y el de cobaya sería difuso, con pocos y pequeños nidos celulares y con tabiques amplios de tejido conectivo. Este hallazgo concuerda con un estudio reciente en cortes de CC humano en el que encuentran que el número de células tirosina hidroxilasa positivas representan del 1 al 2% de los núcleos teñidos con DAPI, haciendo constar los autores que en rata rutinariamente obtienen más del 20% (Ortega-Sáez et al., 2013).

Una vez contextualizados nuestros datos de esta sección en la literatura vigente se puede concluir, al menos provisionalmente, que el CC de cobaya es hipotrófico y que comparado con el de rata es pobre en células quimiorreceptoras-tirosina hidroxilasa positivas, pero no lo es si lo comparamos con el del hombre.

## **2. Cuerpo carotídeo y reflejos respiratorios.**

En concordancia con la generalidad de la literatura nuestro estudio demuestra que el cobaya no hiperventila en respuesta a la hipoxia aguda ni se sensibiliza o aclimata, promoviendo una mayor ventilación a la hipoxia aguda, tras exposición a hipoxia crónica. El patrón ventilatorio en el cobaya de 2 a 5 meses en atmósfera normal consiste en una fR constante, un aumento del VC y una disminución del VM/Kg., ya que el peso corporal aumenta más deprisa que el VC. La hipoxia no altera el patrón ventilatorio en el cobaya y produce un aumento neto del VM/Kg. en la rata. La hipercapnia aumenta el VM/Kg. dependiente fundamentalmente del aumento del VC en cobaya y dependiente del VC y de la fR en rata; el aumento del VM es comparable en ambas especies. El hecho de que los experimentos de rata y cobaya se hayan simultaneado y de que la hipercapnia aumente la ventilación en cobaya, asegura que nuestras observaciones respecto a la hipoxia son genuinas. Los tiempos y flujos inspiratorios y espiratorios en normoxia fueron comparables en ambas especies.

Los VC y VM encontrados en cobaya y en rata a las distintas edades son comparables a los descritos por otros autores (Yilmaz et al., 2005; Wiester et al., 1988, 1990). De hecho según Mortola (2001) esta variación con la edad es común a todos los mamíferos y es paralela al aumento del metabolismo. Hay que pensar que el aumento del VC y mantenimiento de la frecuencia respiratoria tiende a aumentar la ventilación alveolar

y por tanto el aumento de captación de  $O_2$ /Kg. de peso por lo que de hecho la captación de  $O_2$  (el metabolismo) disminuye menos de lo que podría deducirse de la disminución del VM/Kg.

Aunque la intensidad de la hipoxia usada en cobaya en nuestros experimentos fue moderada (10%  $O_2$ ), la misma hipoxia en rata produjo un aumento en la fR y VC arrojando un VM/Kg. que a las dos edades representó un aumento por un factor superior a 2. Schwenke et al. (2007) en sus experimentos redujo el  $O_2$  al 8%  $O_2$  y no detectó aumento de actividad en el NSC ni en ventilación y además la denervación del NSC no afectó a la ventilación. Sin embargo, la VM/Kg. en hipercapnia fue superior a la control por un factor de 2 a todas las edades particularmente en cobayas de dos meses; los datos en rata en hipercapnia fueron casi superponibles a los del cobaya. Teniendo en cuenta que la respuesta a la hipercapnia se genera en torno a un 30-40% en el CC y a un 60-70% en quimiorreceptores centrales (González et al., 1994) los datos sugerirían que el CC es capaz de responder a la hipercapnia (aunque los datos de liberación de CA inducida por los estímulos ácidos, ver Figura 9R, tabla 5R y más adelante, no apoyan esta sugerencia) o, en cualquier caso, que la respuesta ventilatoria al ácido es normal aunque en cobaya tal vez sea mediada casi en su totalidad a nivel central. En este contexto hay que señalar que Schwenke et al. (2007), al cortar el NSC, observaron una disminución en la ventilación producida por hipercapnia (8%  $CO_2$ ) del 28% de la respuesta total. Esta observación de Schwenke et al. (2007) y nuestros datos sugerirían que el CC del cobaya y sus proyecciones centrales son funcionales y que realmente lo que falta en las células quimiorreceptoras es el sensor de  $O_2$  y/o algún otro componente de la maquinaria de transducción hipóxica.

Cabe preguntarse si nuestras condiciones de registro de la respuesta a la hipoxia no son las idóneas para detectar una respuesta, aunque como se ha comentado ya, en idénticas condiciones las respuestas en la rata son evidentes. La hipoxia produce de forma relativamente rápida (Hill, 1959; Mortolla y Frappell, 2000) una caída del consumo de  $O_2$  y si definimos euventilación en cualquier condición como aquella capaz de mantener una captación o transferencia de  $O_2$  en los pulmones adecuada para mantener el metabolismo, ello haría que la hipoxia, por este factor tendería a disminuir la respuesta ventilatoria. Sin embargo, la respuesta ventilatoria generada por el CC es casi instantánea lo que determinaría, en todo caso, que la respuesta a la hipoxia fuera transitoria, esto es, que hubiera un aumento y que al disminuir el consumo de  $O_2$  disminuyera la ventilación, hecho que no ocurre. Además, hay que tener en cuenta que: 1) La caída del metabolismo



es más evidenciable en animales recién nacidos en los que el CC no está innervado y el reflejo quimiorreceptor casi no existe por lo que el CC no estaría involucrado. 2) La depresión hipotérmica en nuestros experimentos sería muy pequeña ya que Hill (1959) encontraba que la temperatura cayó en  $\leq 0.5^{\circ}\text{C}$  en 10 min. en la atmósfera de 10%  $\text{O}_2$ . 3) Los experimentos de Schwenke et al. (2007) a los que nos hemos referido se realizaron en cobayas adultos anestesiados mantenidos a  $39^{\circ}\text{C}$  y los de Curran et al. (1995) en cobayas jóvenes (10-14 días) despiertos y a  $33^{\circ}\text{C}$  (la temperatura neutra en el cobaya que no produce cambio en la temperatura corporal ni en el consumo de  $\text{O}_2$  de acuerdo con Hill, 1959). Ninguno de los dos autores encontraron respuesta ventilatoria a la hipoxia.

Finalmente, los hallazgos en hipoxia crónica en cobaya y rata que muestra la Tabla IIR constituyen una observación adicional que sustenta que el CC de cobaya no responde a la hipoxia. En todos los mamíferos, no sólo se produce un aumento de la ventilación ante una hipoxia hipóxica aguda, sino que ante una hipoxia crónica o sostenida se produce, en el plazo de horas a días según la especie animal (ver Bisgard y Neubauer, 1995), una hiperventilación que es mayor de lo que corresponde a la  $\text{PO}_2$  de la atmósfera. Así, en rata en nuestros experimentos la VM/Kg. basal fue de  $485 \pm 13$ , en hipoxia aguda del 10% se duplicó llegando a  $1010 \pm 42$  y en ratas que han estado expuestas a 10%  $\text{O}_2$  durante 15 días y luego expuestas de forma aguda al 10%  $\text{O}_2$  aumentó a  $1212 \pm 56$  ml/min./Kg. En otras palabras, en términos de ventilación se produce una sensibilización del reflejo quimiorreceptor: para un estímulo de intensidad dada la respuesta ventilatoria es mayor. Esta sensibilización se conoce con el nombre de aclimatación. La aclimatación se consideró que era debida a que en los momentos iniciales de la hipoxia sostenida (de minutos a unas pocas horas) se produce una alcalosis respiratoria como resultado del lavado del  $\text{CO}_2$  y la alcalosis tiende a frenar la ventilación (y también la descarga del NSC). Posteriormente, en el curso de horas-unos pocos días, el riñón compensaría la alcalosis y se levantaría el freno al aumento de la actividad del NSC y de la ventilación producida por la hipoxia (Fidone y González, 1986). Sin embargo el laboratorio de Bisgard (e.g., Dwinel et al., 1997; Bisgard, 2000) demostró que la aclimatación era una respuesta intrínseca del CC que ocurría independientemente de la  $\text{PCO}_2$  del animal. En un trabajo reciente de nuestro laboratorio (Conde et al., 2012b) se demuestra que en la hipoxia crónica hay cambios en la dinámica de neurotransmisores (aumento de la liberación de DA y de adenosina) en el CC que pueden explicar la aclimatación. Además sabemos que hay mecanismos intracelulares de las propias células quimiorreceptoras que contribuyen a la génesis de la aclimatación (e.g., canales iónicos, Cáceres et al., 2007). En suma, a nivel de ventilación no aparece aclimatación a la hipoxia, lo que demostraría que la

maquinaría sensora de la hipoxia o no existe o no es capaz de poner en marcha la aclimatación. Hay que señalar no obstante que Blake y Banchero (1985) encontraron que en animales expuestos a una altitud simulada de 4600 m ( $\approx 10\%$   $O_2$  normobárico) durante 11-15 semanas se produjo un aumento en la ventilación de en torno al 30%. Sin embargo, si se corrige por el aumento del consumo de  $O_2$ , que fue mayor en los animales hipóxicos crónicos, el aumento es de un 11%. Yilmaz et al. (2005) también encuentran que cobayas crecidos durante 4 meses a 3.800 m de altitud hiperventilan (en comparación con los controles crecidos a nivel del mar) y muestran una respuesta a la hipoxia aguda intensa, lo que implicaría que los cobayas no estarían preadaptados a la hipoxia crónica. Estos mismos autores encuentran que la hipoxia aguda en animales crecidos a nivel del mar no produce ninguna respuesta (ver Tabla IA en la Introducción).

### **3. Cuerpo carotídeo y función de las células quimiorreceptoras medida como respuesta secretora de catecolaminas.**

Según se señalaba en la Introducción, el metabolismo de CA en el CC, en realidad en las CQ del CC, constituye un índice de la actividad del propio CC y de las propias células, de tal forma que cuando éstas se activan, el metabolismo de CA se activa también y se produce, además de un aumento de la síntesis, un aumento de liberación proporcional a la intensidad del estímulo (ver Figuras 12 y 15 de la Introducción). Con los resultados obtenidos mediante inmunocitoquímica, los datos de contenido y los de síntesis de CA se pueden establecer algunas relaciones que creemos de interés. Por ejemplo, la superficie tirosina hidroxilasa positiva en cobaya es en torno a 20 veces menor que en la rata. El contenido total de CA (DA + NE) es en torno a 8.7 veces menor y si nos referimos sólo a DA es 10 veces menor, lo que implicaría que la concentración de CA/unidad de superficie (y volumen) es mayor (en torno al doble) en cobaya que en rata. Si nos referimos sólo a DA, ya que una parte muy significativa de NE está en terminaciones simpáticas (Mir et al., 1982), la velocidad de síntesis es 17.5 menor en cobaya que en rata, lo que está muy próximo a la relación de superficie inmunocitoquímicamente positiva a tirosina hidroxilasa. Esta doble relación explica que el tiempo de turnover de la DA en cobaya sea de casi el doble que en la rata: el cobaya tiene una velocidad de síntesis 17,5 veces menor que la rata, pero como tiene 10 veces menos DA tarda sólo aproximadamente el doble de tiempo en renovarse totalmente. En las condiciones de *steady state*, tal y como se realizan nuestros experimentos, la velocidad de síntesis es igual a la velocidad de utilización por lo que podemos decir el CC del cobaya (sus células quimiorreceptoras) utilizarían 17.5 veces menos DA que las de rata (en torno a 1/20

decíamos en resultados). Si ahora nos referimos a la NE del CC, que mayoritariamente se encuentra en terminaciones simpáticas, tenemos que el cobaya contiene 1/6 la cantidad de NE que la rata y la velocidad de síntesis de NE en cobaya es ligeramente superior que en rata (0.23 vs. 0.18 pmole/CC/2h) lo que explica que el tiempo de turnover de NE sea unas 7 veces menor en cobaya que en rata. Y como se ha razonado anteriormente para la DA, resulta que las terminaciones simpáticas del cobaya utilizarían ligeramente más NE las de la rata. Se puede hacer una consideración comparable en la situación de hipoxia crónica, y habríamos de concluir que en esta situación el CC de cobaya utiliza una cantidad de DA que es próxima a 1/12 de la cantidad usada por la rata y una cantidad de NE que es casi la misma que la que usa la rata.

En relación a los datos obtenidos en el GCS, lo primero que hay que tener en cuenta es que la NE está contenida en los somas neuronales, por lo que cabría esperar que la velocidad de turnover fuera menor y por tanto el tiempo de turnover fuera mayor que en las terminaciones, ya que la NE se utiliza preferencialmente en las terminaciones simpáticas y en gran parte es sintetizado en las propias terminaciones por tiroxina hidroxilasa y dopamina beta hidroxilasa transportadas por flujo axónico (Brimijoin y Wiermaa, 1977). En cualquier caso, en condiciones de *steady state* la velocidad de síntesis de NE en el ganglio cervical superior es un índice de la utilización de NE en las terminaciones simpáticas de las neuronas del ganglio. Los datos indican que el cobaya combina, en comparación con la rata, un bajo contenido en NE y una velocidad de síntesis alta por lo que el tiempo de turnover es bajo. Si las terminaciones simpáticas derivadas de las neuronas del ganglio cervical superior son representativas de las de todo el organismo, es posible que en cobaya se produjera un mayor *spillover* de NE a plasma y tal vez una concentración de NE en plasma mayor que en rata (pero ver más adelante). Es muy llamativo que el cobaya contenga una concentración de DA en ganglio cervical superior desproporcionada, 6 veces mayor que en la rata, lo que indicaría una mayor población de células SIF (Small Intensely Fluorescent) en esta especie. Aunque no sabemos su significado funcional, el hecho de que en esta especie el contenido sea tan alto y de que su síntesis aumente en los animales hipóxicos crónicos, sugeriría de acuerdo con otros autores (Hanson et al., 1989; Kummer and Acker, 1997), que los cobayas podrían poseer cierta capacidad para responder a la hipoxia, aunque su acción refleja sería inexistente, ya que las células SIF carecen de axones. Su función sería únicamente la derivada del control de la actividad de las neuronas del ganglio cervical superior a las que modularía (Libet y Owman, 1974).

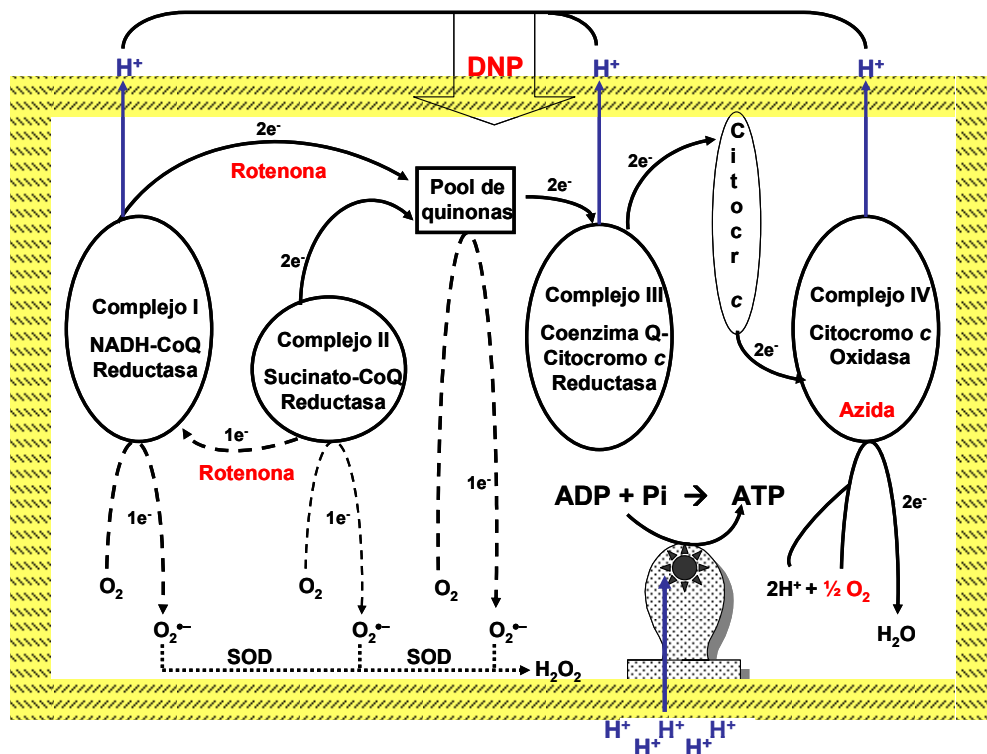
Las Figuras 9R a 13R y la Tabla VR resumen los datos de liberación de CA por las células quimiorreceptoras en respuesta a un gran abanico de estímulos. Llama la atención que no sólo los estímulos naturales, hipoxia moderada (7% O<sub>2</sub>; ≈46 mmHg), hipoxia intensa (2% O<sub>2</sub>; ≈23 mmHg) y el estímulo ácido-hipercápnico (pH 6.8; PCO<sub>2</sub> 80 mmHg), sino también los venenos mitocondriales, fueron ineficaces para activar la respuesta neurosecretora de las CQ, mientras que el alto K<sup>+</sup> extracelular produjo una respuesta secretora comparable a la que produce en la rata ¿Qué significado tienen estas observaciones?

La ausencia de respuesta al estímulo ácido-hipercápnico en el cobaya no sorprende ya que en rata es pequeña (Tabla VR; Vicario et al., 2000b) y también lo es en gato y conejo en comparación con la respuesta evocada por la hipoxia y los venenos metabólicos (Figura 15 de la Introducción). De hecho, Rigual et al. (1984) propusieron que los estímulos ácidos tal vez estimularan de forma directa e intensa a las terminaciones del NSC, de tal forma que la ventilación al estímulo ácido mediada por el CC plausiblemente se debiera más a esta acción directa sobre las terminaciones que a la acción mediada por las CQ.

La respuesta secretora inducida por alto K<sup>+</sup> en cobaya es comparable a la obtenida en la rata en éste y otros estudios (e.g. González-Martín, 2008) aunque menos intensa que la obtenida en CC de gato (Almaraz et al., 1986). Fue en este último estudio en el que nuestro laboratorio demostró de forma inequívoca que en las CQ el potencial de membrana era dependiente de K<sup>+</sup> ya que el alto K<sup>+</sup> extracelular promovía una respuesta secretora que se ajustaba razonablemente a la ecuación de Nernst y que era dependiente de la entrada de Ca<sup>2+</sup> extracelular. Posteriormente se demostró en CC de conejo y de rata que la respuesta secretora era sensible a los bloqueantes dihidropiridínicos de canales de Ca<sup>+</sup> voltaje dependientes (Obeso et al., 1992; Rocher et al., 2005). Nuestros datos también muestran que la hipoxia crónica promovió que las CQ respondieran de forma más intensa al K<sup>+</sup> extracelular, esto es, la hipoxia crónica sensibiliza las células al estímulo despolarizante. Tal vez simplificando los hechos podríamos decir que la respuesta al alto K<sup>+</sup> implica las siguientes etapas mínimas: alto K<sup>+</sup> → despolarización → activación de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje → entrada de Ca<sup>2+</sup> en las células → activación de la respuesta neurosecretora. Por tanto, la sensibilización podría ocurrir a cualquiera de estos niveles. Sin embargo el laboratorio del Prof. Chris Peers ha demostrado en CQ de rata que las corrientes de Ca<sup>2+</sup> y su perfil farmacológico no cambian en hipoxia crónica (Wyatt et al., 1995; Peers et al., 1996), como tampoco cambió el potencial de membrana.

Por tanto cabe postular que en el cobaya, además de la posible inducción de canales  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje (Stea et al., 1992; Cáceres et al., 2007), que desde luego ocurre en la rata, se produzca una sensibilización de la maquinaria exocitótica al  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, de tal forma que, para una misma concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la interacción  $\text{Ca}^{2+}$ -dependiente entre proteínas vesiculares y proteínas de la membrana plasmática, que conduce a la exocitosis, sea más eficaz (Ghijssen y Leenders, 2005).

La incapacidad de las CQ de cobaya para responder a los venenos metabólicos, podría deberse en primer lugar a que la cadena respiratoria en las células de cobaya no fuera sensible a los venenos mitocondriales ni al protonóforo dinitrofenol (DNP). Sin embargo, esto parece poco probable ya que estos venenos son bloqueantes metabólicos efectivos en otros tejidos del cobaya (Köhnke et al., 1997; Peasley y Shi, 2002; Bao et al., 2009). En consecuencia, lo que si que harían nuestros datos es demostrar que la disminución de los niveles de ATP no constituye *per se* una señal **suficiente** para activar a las CQ como proponía la hipótesis metabólica (Figura 1D; ver también Introducción).



**Figura 1D.** Esquema general de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa, indicando en rojo el lugar de acción de los venenos mitocondriales usados que inhiben (rotenona y azida) o cortocircuitan (DNP, dinitrofenol) la cadena respiratoria. La hipoxia, si es muy intensa, también puede parar la cadena respiratoria, ya que el  $\text{O}_2$  es el aceptor final de los equivalentes de reducción de los nutrientes. La figura también recoge el bombeo de  $\text{H}^+$  fuera de la matriz mitocondrial, a nivel de los complejos I, III y IV, y su reingreso siguiendo el gradiente electroquímico para los  $\text{H}^+$  que finalmente proporciona la energía para sintetizar ATP a partir de ADP+ Pi.

Hemos de aclarar que el DNP a las concentraciones utilizadas en nuestro estudio es capaz de disminuir los niveles de ATP en el CC de gato y de rata (Obeso et al., 1989; Gómez-Niño et al., 2009b), aunque a concentraciones más bajas (100  $\mu$ M), capaces de activar la liberación de CA y las descargas en el NSC, el efecto desacoplante del DNP se compensa con un aumento de la oxidación de glucosa por lo que se mantienen los niveles de ATP. El DNP no aumenta la producción de anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) en tejidos de rata a la concentración usada en esta Tesis, pero la rotenona y la azida sódica, según ilustra la figura, aumentan la producción de  $O_2^{\bullet-}$  que causa un fuerte estado oxidativo en las células (Gómez-Niño et al., 2009b).

Finalmente, pero lo más importante desde el punto de vista fisiológico, es el hecho de que tal vez la hipoxia moderada del 7%  $O_2$  capaz de activar a las CQ de rata (ver Tabla VR) probablemente no disminuya los niveles de ATP. Sin embargo, la hipoxia intensa (2%  $O_2$ ), utilizada en otra serie de experimentos, es muy probable que sí los disminuya (Obeso et al., 1985; Verna et al., 1990). También es probable que ambas hipoxias aumenten la producción de  $O_2^{\bullet-}$  (Taylor y Moncada, 2010; Quintero et al., 2013). Por tanto, las especies reactivas de oxígeno,  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  (ver Figura 1D) *per se* tampoco serían señales suficientes para activar la quimiorrecepción. Sin embargo, según se ha comentado en la Introducción, Biscoe y Duchon en 1992 y Buckler y Turner en 2013 arguyen que las mitocondrias de las CQ son especiales y que su cadena respiratoria, que en conjunto muestra una baja afinidad por el  $O_2$ , sería el sensor de  $O_2$ . Por ello, la hipoxia moderada que las CQ detectan disminuiría los niveles de ATP, y esta disminución sería el principal responsable de la inhibición de los canales *leaky* de estas células y de su despolarización durante la hipoxia (ver Varas y Buckler, 2007). El mismo mecanismo sería el responsable de sus activación por los venenos metabólicos.

Sin embargo, en un estudio muy reciente Turner y Buckler (2013) encuentran que en las CQ de ratones doble *knock-out* para canales TASK-1 y TASK-3 la respuesta a la hipoxia y a los venenos metabólicos se conserva prácticamente intacta. Esta observación les lleva a concluir que deben existir otros canales con sensibilidad a la hipoxia capaces de compensar la pérdida de estos canales *leaky*. Curiosamente, a pesar de las fuertes críticas que el Prof. Buckler realizó al posible significado funcional de los maxi- $K^+$  en la génesis de la respuesta a la hipoxia (ver Gómez-Niño et al., 2009 para referencias), argumenta la posibilidad que tal vez el maxi- $K^+$  sea uno de los canales responsables de la génesis de la respuesta hipóxica en sus dobles *knock-outs*. En definitiva, seguimos sin saber cuál es el factor de acoplamiento entre el presunto sensor de  $O_2$  y los canales de

$K^+$ , y seguimos sosteniendo la propuesta de que el sensor de  $O_2$  es una proteína integral o íntimamente asociada a la membrana que alostéricamente regula la probabilidad de apertura de los canales de  $K^+$  fueran estos los que fueren (ver Figura 13 en la Introducción). En cualquier caso, la cadena respiratoria mitocondrial no parecería el sensor, ni el ATP el factor de acoplamiento, a menos que asumamos que el canal o canales que retoman de forma compensatoria el papel de primeros efectores hipóxicos en los doble *knock-outs* también sean sensibles al ATP. En este contexto cabe mencionar que las CQ expresan canales de  $K^+$  sensibles a ATP ( $K_{ATP}$ ; Kim et al., 2011b) pero que su funcionamiento es inverso a lo que se requiere para generar la respuesta a la hipoxia: es el aumento del ATP quien cierra los canales y conduce a la despolarización celular. De hecho, este es el mecanismo por el que el aumento de glucemia postabsortiva causa la secreción de insulina en las células beta del páncreas (aumento de glucemia  $\rightarrow$  mayor entrada de glucosa en las células beta  $\rightarrow$  mayor glicólisis-oxidación de glucosa  $\rightarrow$  aumento del ATP  $\rightarrow$  inhibición de los canales  $K_{ATP}$   $\rightarrow$  despolarización de las células beta  $\rightarrow$  entrada de  $Ca^{2+}$  por canales dependientes de voltaje  $\rightarrow$  secreción de insulina). Además, los  $K_{ATP}$ , que en parches aislados de CQ de rata se inhiben por ATP y glibenclamida (un antidiabético oral clásico), en las células CQ íntegras (registradas en *cell-attached*) no son sensibles a los cambios metabólicos agudos tales como la hipoxia intensa, la aplicación de cianuro o la perfusión con un medio sin glucosa. La glibenclamida tampoco afectó a los niveles de  $Ca^{2+}$  intracelulares producidos por el cianuro (Kim et al., 2011b). En suma, las células expresan los canales  $K_{ATP}$  pero no están acoplados al metabolismo celular.

#### **4. Cuerpo carotídeo y función de las células quimiorreceptoras medida como transitorios de calcio intracelular.**

Este objetivo intenta explorar la posibilidad de que, aún cuando no existiera un paralelismo entre la liberación de CA y ventilación, tal vez sea algún otro neurotransmisor el que acople las CQ a las terminaciones sensoriales del nervio del seno carotídeo (NSC). En tal caso, la hipoxia debería promover un aumento de  $Ca^{2+}$  en las CQ que habría de poner en marcha la liberación regulada del neurotransmisor alternativo. A este nivel de la Discusión, y con la información que hemos presentado en la sección de Resultados, resulta razonable reformular el planteamiento del objetivo tal y como fue formulado al inicio de este trabajo. Parece obvio que si las CQ son sensibles a la hipoxia y liberan alguna sustancia, aun cuando fuera una sustancia químicamente idéntica a un neurotransmisor, no deberíamos considerarlo neurotransmisor, en el sentido de que no

transmite, no acopla las CQ a las terminaciones sensoriales del NSC al menos durante la hipoxia (Schwenke et al., 2007). La hipotética sustancia tal vez sí pudiera considerarse neurotransmisor en el caso de los venenos metabólicos, ya que el cianuro aumenta las descargas en el NSC (Schwenke et al., 2007). Pero ocurre que los venenos metabólicos son capaces de activar las neuronas del ganglio petroso (Alcayaga et al., 1999) mientras que la hipoxia no lo es (Stea y Nurse, 1992), lo que implica, en primer lugar, que no es necesario un neurotransmisor para que los venenos metabólicos aumenten las descargas en el NSC y en segundo lugar, implicaría también que los venenos metabólicos y la hipoxia no activarían a la CQ por los mismos mecanismos a pesar de las opiniones del Prof. Buckler expresadas en párrafos anteriores. De hecho, Obeso et al. en 1989 ya concluían que la disminución de los niveles de ATP no era un requisito para la activación de los quimiorreceptores del CC.

En definitiva, los experimentos de medida de transitorios de  $Ca^{2+}$  intracelular lo que exploran de forma genérica es si la hipoxia es capaz de activar a las CQ generando una respuesta que es básica en la activación de cualquier tipo celular. Los datos de las figuras 14R a 16R son concluyentes: el alto  $K^+$  es capaz de activar las CQ generando un aumento de  $Ca^{2+}$  comparable al que produce en las CQ de rata, sin embargo, ni la hipoxia ni los venenos metabólicos son capaces de aumentar el  $Ca^{2+}$  intracelular. Estas observaciones permiten concluir de forma inequívoca que las CQ expresan vías de entrada de  $Ca^{2+}$ , muy probablemente canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje (Obeso et al., 1992; Rocher et al., 2005), que se activan al despolarizarse las células y que la hipoxia y los venenos metabólicos no son capaces de activar.

### **5. Verificar la existencia de corrientes de $K^+$ sensibles a la hipoxia en las CQ del cobaya.**

El objetivo a que hace referencia esta sección se enunció así: la presencia de canales de  $K^+$  sensibles a la hipoxia y su inhibición por la disminución de la  $PO_2$  constituyen el primer efector-efecto de la respuesta a la hipoxia en las CQ. La pregunta es ¿poseen las CQ del CC de cobaya este primer elemento efector de la cascada de transducción del estímulo hipóxico? En los términos que se utilizaban en el párrafo anterior podríamos re-enunciarlo preguntándonos si las CQ poseen corrientes de  $K^+$  que sean inhibidas por hipoxia y por tanto, capaces de inducir despolarización. Los datos de las figuras 17R y 18R indican que no las poseen o para ser más precisos que sólo un pequeño porcentaje de CQ del CC de cobaya las expresan.

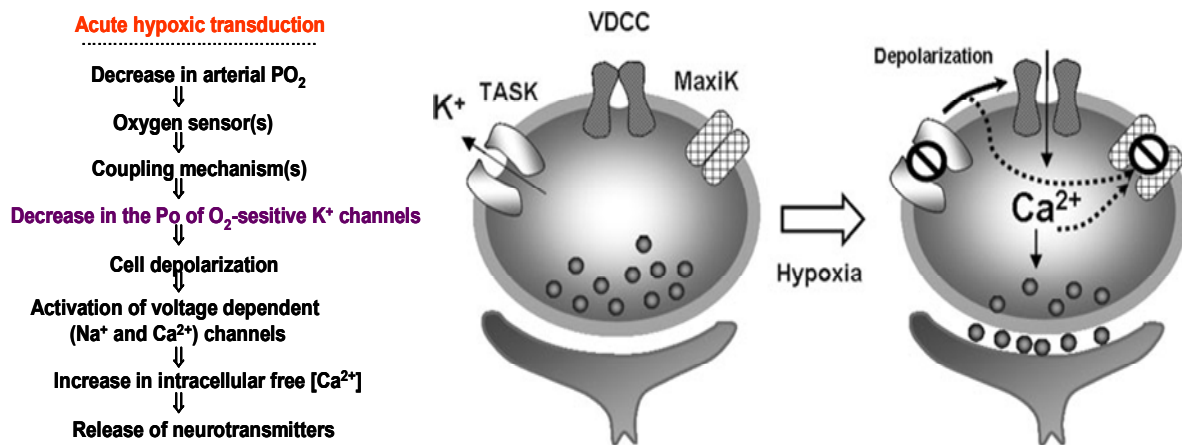


Las familias de curvas de las CQ de cobaya y rata registradas y presentadas en la Figura 17R indicarían que en el cobaya las corrientes de  $K^+$  poseen ligeramente mayor amplitud y una cinética de activación más rápida que la rata, sugiriendo también que no hay componentes importantes de corrientes de  $K^+$  que sean dependientes de  $Ca^{2+}$ . Pero obviamente lo más llamativo cuando se comparan las corrientes de las CQ de cobaya y rata es que la familia de curvas de las CQ de cobaya son idénticas en normoxia e hipoxia, mientras que en la rata la hipoxia produce una inhibición marcada de las corrientes de  $K^+$ . Es decir, las corrientes de cobaya no poseerían ningún componente que se inhiba por la hipoxia, mientras que las de rata poseen uno o más componentes sensibles a la hipoxia.

La Figura 18R muestra que en el cobaya de las 12 CQ registradas sólo una (esto es, el 8% de las CQ) muestra algún componente sensible a la hipoxia mientras que en la rata son sensibles 6 de las 9 CQ registradas (66% de las CQ). Pero si a estos datos sumamos las dieciséis CQ de cobaya registradas en  $Ca^{2+}$  que no respondieron a la hipoxia y sí lo hicieron al alto  $K^+$ , indicando que eran células que poseían corrientes de  $K^+$  y  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, tendríamos que de 28 CQ de cobaya registradas sólo una (3.6%) poseería componente de corrientes sensibles a la hipoxia y capaces de despolarizar las células. Siguiendo el mismo razonamiento para los registros en la rata tendríamos que de las 38 CQ registradas sólo 3 (7.8%) no mostraron componentes capaces de despolarizar las células en respuesta a la hipoxia. Finalmente queremos comentar que, aunque las condiciones de registro no fueron óptimas para evidenciar el componente de la corriente de  $K^+$  sensible a  $Ca^{2+}$ , es evidente que las CQ de rata la poseen como indica la pequeña "joroba" hacia arriba de las curvas I/V en el rango de 0 a +40mV de Em.

Ayudados por el esquema de la cascada de transducción del estímulo hipóxico que se presentaba en la Figura 13 de la Introducción, es posible hacer alguna consideración o hipótesis sobre qué pieza o piezas de la maquinaria quimiotransductora le falta a las CQ de cobaya. Replanteando la Figura 13 de la Introducción podemos presentarla como Figura 2D. Experimentalmente, demostramos que desde la despolarización hacia abajo (siguiendo el diagrama de flujo) las CQ de cobaya expresan funcionalmente todos los elementos: las células se despolarizan, poseen canales de  $Ca^{2+}$  sensibles al voltaje y una maquinaria excitotóxica robusta. Está claro que no expresan, funcionalmente hablando, canales de  $K^+$  sensibles a la hipoxia (marcado en color morado en la Figura 2D). Sin embargo, a partir de esta afirmación nos movemos en la pura especulación. Para empezar no parece que los canales de  $K^+$  sensibles a la hipoxia sean

isoformas especiales de una familia o subfamilia de canales, aunque como se ha comentado al discutir la Figura 14 de la Introducción algunos autores hayan propuesto lo contrario (McCartney et al., 2005) y datos posteriores no hayan confirmado sus propuestas (Ross et al., 2011). Ello implicaría que, molecularmente, las CQ de cobaya sí que expresan canales de  $K^+$  susceptibles de ser inhibidos por hipoxia: lo que les faltaría sería o bien el sensor de  $O_2$  o bien los mecanismos de acoplamiento (González et al., 2009).



**Figura 2D.** Cascada de transducción del estímulo hipóxico. El modelo de la parte derecha de la Figura está tomado de González et al. (2009).

En la Figura 2D, en el modelo o diagrama de flujo, lo que no expresarían las CQ de cobaya serían elementos correspondientes a las dos primeras etapas, y en el modelo de la derecha lo que faltaría sería la flecha que desencadena los cambios producidos por la hipoxia, ya que las CQ de cobaya poseen los efectores (canales de  $K^+$ , canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje, neurotransmisores y maquinaria de excitación). Falta el mecanismo de disparo sensible a la hipoxia que produzca el estado de transición que recoge la figura. Dado que no se conocen la naturaleza del sensor de  $O_2$  ni los mecanismos de acoplamiento entre el sensor de  $O_2$  y el primer efector (los canales de  $K^+$ ) en ninguna especie, no ha sido posible progresar más. Según se mencionaba en párrafos anteriores, no parece que las especies reactivas de  $O_2$  ni el ATP sean los mecanismos de acoplamiento.

## **6. Analizar los efectos de la hipoxia sobre la presión arterial, glucemia, lactacidemia y niveles de catecolaminas plasmáticas y la posible sensibilidad directa de las células cromafines de la MA a la hipoxia.**

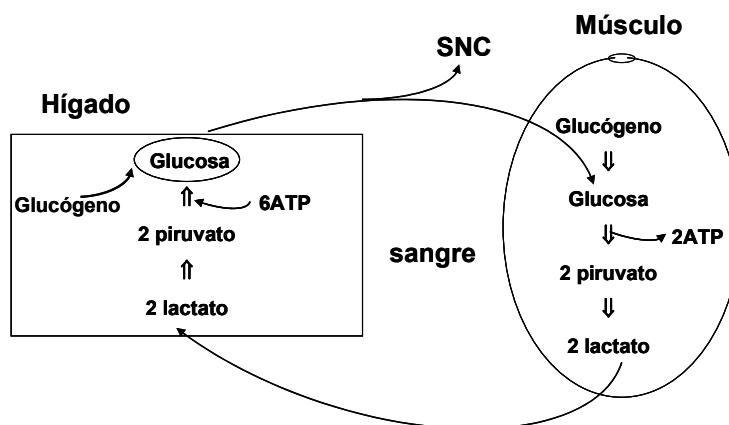
En la sección de objetivos al presentar el sexto y último objetivo de nuestro trabajo, se fundamentaba en estos términos: “En los animales recién nacidos, que carecen de actividad quimiorreceptora, la MA se activa intensamente en respuesta a la hipoxia, dando como resultado un aumento muy marcado en plasma y en todo el medio interno de epinefrina y norepinefrina, que luchan contra la hipoxia activando distintas rutas metabólicas. Además, esta respuesta se debe a que las células cromafines de la MA son directamente sensibles a la hipoxia. Supuesto que el cobaya adulto no hiperventilara en respuesta a la hipoxia, ¿conservarían sus células cromafines la sensibilidad a la hipoxia que muestran los animales neonatos?” Los datos correspondientes a este objetivo han sido presentados en las Figuras 19R a 23R.

Al inicio de la discusión de los datos obtenidos en el contexto de este objetivo, hay que señalar que la hipótesis planteada sobre la sensibilidad intrínseca de las células cromafines del cobaya adulto a la hipoxia, ha generado resultados que indican que no son sensibles, que se comportan de forma análoga a las de la rata adulta (Seidler y Slokin, 1985; Slokin y Seidler, 1988; Rico et al., 2005).

Los datos de la Figura 19R permiten hacer una serie de comparaciones, pero en su conjunto resulta difícil establecer cuál de ellas es la fisiológicamente relevante. Holzbauer y Sharman (1972) hacen una serie de consideraciones que parecen más la constatación de observaciones que la supuesta implicación funcional de las mismas. Por ejemplo, sugieren que los animales cazadores, carnívoros en general, tendrían los niveles de NE proporcionalmente más altos que los no carnívoros. Sin embargo, esta regla aparentemente general no encaja con el hecho de que el cerdo y la cabra tengan niveles muy altos de NE, en torno al 50% de la CA medulares. También los mismos autores sugieren que los animales jóvenes serían más noradrenérgicos, a la vez que se señalan que puede haber diferencias marcadas en las proporciones de NE y E en gatos de distintas camadas. Finalmente y, esto parece obvio, hay una relación directa entre niveles de E en MA y porcentaje de células que son positivas a feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) el enzima que transforma la NE en E (Wong, 2006). Sea como fueren las cosas, el caso es que en rata la proporción E/NE en medula adrenal se estima en torno a 4-5 (esto es en torno al 20-25% de las CA totales es NE), y en cobaya, al igual

que el hombre o el mono mandril, casi el 100% de las CA en médula es E (Holzbauer y Sharman, 1972; Wong, 2003, 2006). Por tanto estos datos de la literatura ratifican nuestras medidas en términos cualitativos, pero no en términos cuantitativos ya que Holzbauer y Sharman (1972) dan valores totales de CA para la rata 10 veces mayores que en cobaya y en este estudio se encuentran valores totales muy similares. De otro lado, es común que los pesos se expresen por glándula y no por médula (e.g. Holzbauer y Sharman, 1972; Israel et al., 1982) lo cual dificulta aún más las comparaciones.

En la sección de Resultados se sugería que el mayor contenido en E de la médula de cobaya podría indicar un mayor papel en el control de las funciones metabólicas. El simpático en su conjunto, incluida la MA, juega un papel clave en los ajustes de todo el organismo que soportan la reacción de defensa y huida, *the fight and flight response* (Cannon, 1945; Kjaer, 2005). Estos ajustes preparan para la actividad física de la defensa o la huida, y preparan también para la actividad física que el ejercicio humano representa (Kjaer, 2005). Estos ajustes afectan sobre todo al aparato cardiocirculatorio y al metabolismo intermediario: aumento de frecuencia cardiaca, de contractibilidad del miocardio, del tono vasomotor, de la presión arterial, de la glucemia, de la lactacidemia, de la glucogenolisis hepática y muscular, de la neoglucogénesis (ciclo de Cori o ciclo del ácido láctico) de la lipólisis y cetogénesis y un aumento del consumo de oxígeno sustentado por un aumento de la ventilación.



**Figura 3D.** El Ciclo de Cori o ciclo del ácido láctico.

La situación de estrés que se aplicó a los animales fue hipoxia, que en el animal intacto genera una respuesta compleja. Según se comentó en la Introducción, en animal intacto, la hipoxia activa a los quimiorreceptores del CC y ello tiende a aumentar la PA por acción del sistema nervioso simpático. Además, la hipoxia produce vasodilatación

generalizada que se opone al efecto del reflejo quimiorreceptor y genera una hipotensión detectada por los barorreceptores que tienden a contrarrestarla. De otro lado, la hiperventilación generada por el propio reflejo quimiorreceptor modifica las presiones intratorácicas y afecta al retorno venoso (González et al., 1994; Kumar, 2008). El efecto neto es que se produce una hipotensión como muestran los datos de la Figura 20R y, aunque en términos porcentuales la hipotensión es más intensa en la rata que en el cobaya, dada la hipotensión relativa del cobaya en condiciones basales, la PA absoluta resultante es menor en cobaya que en rata (PA de 33 mmHg en cobaya y de 60 mmHg en rata). Estos hallazgos son poco clarificadores respecto a la participación diferencial de la E o NE en una u otra especie, y por tanto no son indicativos de que las células de la MA sean o no sensibles a la hipoxia (la E es de origen exclusivamente adrenal). Tal vez una consideración previa a hacer respecto a los datos de la Figura 20R es la hipotensión en que viven los cobayas en relación con la rata (Feuerstein et al., 1985; Bernareggi et al., 1999; Xu et al., 2003). Con los datos del presente estudio, se puede sugerir que la diferencia en la PA entre ambas especies se debe a los distintos niveles de NE en el ganglio cervical superior (en el simpático en general) y el alto contenido en DA en el mismo que actuaría como modulador inhibitorio (ver Willems et al., 1985). Sin embargo, hay que preguntarse: ¿son las diferencias en los niveles de NE en plasma (en torno a un 40% mayores en la rata; Figura 22R) suficientemente distintos como para explicar las diferencias tan marcadas en PA? Hay que hacer notar que la presión en la circulación menor, presión media en la arteria pulmonar, es igualmente baja si se la compara con la de la rata. En un trabajo reciente de nuestro laboratorio se encontró que era de 6 mmHg (Ferrer et al., 2011) y Wright et al. (2006) encuentran que es aún más baja, de 7 cm de H<sub>2</sub>O (5,15 mmHg) mientras que en la rata los valores basales registrados en el laboratorio oscilan entre 12 y 15 mmHg (González-Martín, 2008; Prieto Lloret et al., 2014). Obviamente esta circulación sistémica y pulmonar de baja presión suponen un trabajo para los ventrículos correspondientes mucho menor (Trabajo cardíaco = Presión arterial media x gasto cardíaco).

Otra diferencia notable entre ambas especies es la PaO<sub>2</sub>. Los datos de la literatura son escasos, pero según se señalaba en la sección Resultados otros autores han realizado la misma observación (Feuerstein et al., 1985). Teniendo en cuenta que la ventilación pulmonar total, el VM, es comparable en ambas especies (Figura 6R y Tabla IIR) y que el espacio muerto se estima que representa un tercio del VC en animales pequeños (Crosfill y Widdicombe, 1961), la ventilación alveolar y por tanto la P<sub>A</sub>O<sub>2</sub> también han de ser iguales ya que las PaCO<sub>2</sub> son comparables (Feuerstein et al., 1985).

Con esta premisa, sólo podría explicarse la PaO<sub>2</sub> tan baja en cobaya por un *shunt* fisiológico exagerado o por una difusión pulmonar menor en cobaya que en rata, o por una mezcla de ambos factores ya que ambas cursan con una PCO<sub>2</sub> normal. De hecho Yilmaz et al. (2005b; ver también Yilmaz et al., 2008) encuentran una difusión de CO en cobaya (DL<sub>CO</sub>) de 0.32 ml·min<sup>-1</sup>·mmHg<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup> que, según discuten estos autores, es próxima a la mitad que la publicada por otros autores para la rata que oscila entre 0.49 y 0.70 ml·min<sup>-1</sup>·mmHg<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>. Obviamente estos datos implicarían que la PO<sub>2</sub> tisular en cobaya debe ser más baja que en rata. Pero también hay que tener en cuenta que la captación de O<sub>2</sub> a nivel pulmonar (que es igual al consumo de O<sub>2</sub> en el organismo) encontrados en los dos estudios antes mencionados (Yilmaz et al., 2005b, 2008) en cobaya es de 12.7 ± 3.1 y 11.4 ± 1.5 ml·min<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup> y en un estudio muy reciente en la rata (Yilmaz et al., 2014) el consumo de O<sub>2</sub> que encuentra es 26.1 ± 3.3 ml·min<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>.

Los datos de la Figura 21R muestran que la hipoxia produce cambios superponibles en la glucemia en ambas especies y partiendo del hecho de que los niveles basales de lactato en plasma son más altos en rata, el patrón de la respuesta a la hipoxia es idéntico. El hecho aparentemente paradójico es que el cobaya con PO<sub>2</sub> basal más baja tiene también el lactato más bajo. Si tenemos en cuenta la Figura 3D, los datos de la Figura 21R no indican una participación preferencial de la E en ninguna de las dos especies en las respuestas generadas por la hipoxia, que haga pensar en una activación directa de MA por la hipoxia en cobaya.

Los niveles de NE en plasma (Figura 22R) son más altos (en torno a un 40%) en rata que en cobaya, como cabe esperar del contenido de NE en ganglio cervical superior (asumiendo que los datos del ganglio cervical son representativos de todo el simpático). Sin embargo, el patrón de respuesta a la hipoxia es razonablemente comparable: en ambas especies se llega en la tercera hipoxia a niveles de en torno a 2.5 veces mayores que los encontrados en la hipoxia primera, aunque es cierto que la subida es más gradual (lenta) en cobaya que en rata. El patrón de aumento de la E en cobaya es casi idéntico al de NE lo que sigue indicando que no hay una liberación preferencial de E en respuesta a la hipoxia en esta especie, y lo mismo es cierto en la rata, aunque en la tercera hipoxia los niveles se disparan debido a uno de los tres valores que pudimos determinar en esta especie fue anómalamente alto. En valores absolutos los niveles de E, aunque un ≈20-25 más altos en cobaya en las dos primeras hipoxias, son también comparables en ambas especies. Como se comentó en la sección de Resultados, los niveles de NE y E en plasma son comparables aunque en MA la NE represente un porcentaje menor, siendo

ello debido a que se estima que en torno al 80% de la NE circulante proviene de las terminaciones simpáticas. Finalmente, en la Figura 23R se muestra que en médula aislada la hipoxia no promueve la liberación de CA en ninguna de las dos especies. Las observaciones en rata confirman los hallazgos originales de Seidler y Slotkin (1985, 1986) *in vivo* y los de Rico et al. (2005) *in vitro*, y, en contra de la hipótesis planteada en este objetivo 6, los datos demuestran que el cobaya se comporta como la rata adulta.

Como se ha mencionado, la hipoxia *in vivo* en animal intacto genera respuestas complejas, directas unas e indirectas otras. Pero es obvio que entre estas respuestas no se encuentra una acción directa sobre la MA aumentando la secreción de CA. En ambas especies por tanto la secreción de CA de la MA se activa merced a mecanismos reflejos. En la rata los mecanismos reflejos son dobles, el reflejo quimiorreceptor (Ciriello y Moreau, 2013) y el barorreceptor (Scheffers et al., 2010) pero en el cobaya el mecanismo reflejo ha de ser únicamente el barorreceptor. Tal vez la mayor ganancia de este reflejo en cobaya explique que la caída de la PA en la hipoxia sea menor en esta especie, aunque tal vez pueda ser debido a que la hipoxia genera una menor vasodilatación sistémica.

Si en el cobaya no hay hiperventilación en respuesta a la hipoxia y tampoco hay una respuesta de la MA como ocurre en los animales neonatos cuyo reflejo quimiorreceptor aún no es funcional, ¿cómo se defienden los cobayas de la hipoxia? En la Introducción se comentó que los mamíferos ponen en marcha una serie de mecanismos que posibilitan su adaptación a situaciones en que disminuye la fuerza fundamental que gobierna el paso de  $O_2$  desde la atmósfera a las mitocondrias, esto es, el gradiente de  $PO_2$  desde el medio ambiente al interior de las mitocondrias (Frappell et al., 2007). Existen dos mecanismos adaptativos de instauración casi instantánea, la vasoconstricción pulmonar hipóxica y la hiperventilación mediada por el CC, que tienden a mantener ese gradiente cuando la  $PO_2$  en el ambiente disminuye de forma aguda (hipoxia aguda). Cuando la disminución de la  $PO_2$  en el ambiente es duradera, y a pesar de actuación de los dos mecanismos anteriores, no se mantiene el gradiente de  $O_2$  del ambiente a la mitocondria, un tercer mecanismo se pone en marcha, el aumento de la eritropoyesis que trata de asegurar que la cantidad de  $O_2$  que llega a los tejidos por unidad de tiempo se mantenga y se minimice la disminución de la  $PO_2$  tisular. Los datos aquí presentados demuestran que el cobaya no posee el mecanismo más importante de adaptación a la hipoxia aguda, el reflejo quimiorreceptor, y tampoco hay mecanismos hormonales que como en los recién nacidos suplan la falta de quimiorreceptores funcionales. De otro lado, la vasoconstricción pulmonar hipóxica en cobaya es escasa en comparación con la rata

(Swenson, 2013) y la eritropoyesis que la hipoxia crónica genera también es escasa en comparación con la rata (Turek et al., 1980; González-Martín, 2008 vs. Olea et al., 2011).

Parece que la adaptación a la hipoxia aguda y a la crónica en los animales nativos a grandes alturas descansa en cambios rápidos y en cambios estables en la afinidad de la hemoglobina para el O<sub>2</sub> (Winslow, 2007). Sin embargo, estos cambios no afectan de manera sistemática a todas las especies nativas de grandes alturas; por ejemplo, los hombres nativos de grandes alturas no tienen cambios permanentes o estables en la estructura molecular de su hemoglobina en comparación con nativos a nivel del mar (Winslow et al., 1981; Frappell et al., 2007; Pairet y Jaenicke, 2010), algo que se ha considerado debido a los escasos años, en comparación con otras especies, que los humanos llevan viviendo a grandes alturas.

Los efectores fundamentales de los cambios rápidos como son la alcalosis resultante de la hiperventilación y la disminución de la PCO<sub>2</sub>, que aumentan la afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub>, no actuarían en el cobaya ya que no hay hiperventilación y en situaciones agudas no hay aumentos apreciables de la concentración de 2,3-difosfoglicerato que se opongan a la alcalosis para facilitar la descarga de O<sub>2</sub> a nivel tisular (Winslow, 2007; Weber, 2007; Pairet y Jaenicke, 2010) con lo que en el cobaya no parecen existir cambios agudos en la afinidad de la hemoglobina. La magnitud de estos cambios agudos se aprecia cuando se comparan las afinidades de la hemoglobina en el hombre a nivel del mar y en el Everest: el pH aumenta hasta 7.78 y la PaCO<sub>2</sub> desciende hasta 7.5 mmHg, lo que determina que la P<sub>50</sub> disminuya de 26 mmHg a 19.4 mmHg posibilitando un grado aceptable de saturación de la hemoglobina a pesar de que la PaO<sub>2</sub> es de 30-32 mmHg en la cima del Everest.

Los cambios o mecanismos estables de defensa frente a la hipoxia conllevan cambios en la estructura molecular de la hemoglobina que producen de forma permanente un aumento de afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub> (Frappell et al., 2007; Pairet and Jaenicke, 2010). La estructura primaria de la hemoglobina del cobaya se conoce desde finales de los 70 (Braunitzer et al., 1979), pero sólo recientemente se ha obtenido explicación de cómo esta estructura primaria concreta era responsable de la afinidad de la hemoglobina del cobaya, que es considerablemente mayor que la de los mamíferos de su tamaño que viven a nivel del mar (Yilmaz, et al., 2005; Pairet y Jaenicke, 2010). En la llama y en la vicuña hay una mutación en las cadenas β (His2 →Asn) que hace disminuir la afinidad de la hemoglobina por el 2,3-difosfoglicerato y por tanto su poder para disminuir alostéricamente la afinidad de la hemoglobina por el O<sub>2</sub> (Bauer et al., 1980). En



el cobaya la interacción entre la hemoglobina y el 2,3-difosfoglicerato es normal pero en las cadenas  $\alpha$  que tienen una homología con las de la hemoglobina humana del 75% hay una sustitución de una prolina muy conservada (P44) por una histidina (H44). La información obtenida del análisis cristalográfico realizado por Pairet y Jaenicke (2010) parece sugerir que esta sustitución crea interacciones entre la cadena  $\alpha$  y la cadena  $\beta$  que producen una disminución de la estabilidad de la hemoglobina en su estado T (tenso o desoxigenado o de baja afinidad por el oxígeno) y una estabilización en el estado R (relajado u oxigenado, o con interacciones débiles entre las cadenas o de alta afinidad por el  $O_2$ ). Este desplazamiento del equilibrio de las conformaciones T y R hacia el estado R en la estructura cuaternaria de la hemoglobina sería, en definitiva, lo que produce el aumento de afinidad de la hemoglobina del cobaya, aunque es posible que existan mecanismos adicionales que contribuyan a dicho aumento de afinidad. Pero, ¿es realmente ventajoso poseer una hemoglobina de alta afinidad? En los humanos, destinados a vivir en atmósferas con alta  $PO_2$ , el aumento de afinidad de la hemoglobina por mutaciones es perjudicial como lo demuestran las aproximadamente cien hemoglobinopatías de este tipo. En estas hemoglobinopatías no se cede adecuadamente  $O_2$  a nivel tisular y hay hipoxia tisular que conduce a un aumento de eritropoyetina y policitemias que causan alteraciones cardiocirculatorias y coagulopatías (Wajcman y Galacteros, 2005). Sin embargo, en especies destinadas a vivir en atmósferas pobres en  $O_2$ , el aumento de afinidad de la hemoglobina por el oxígeno es beneficioso (Weber, 2007; Storz y Moriyama, 2008). El ejemplo más cercano de esta afirmación es el hecho de que en el feto, destinado a vivir en un ambiente con baja  $PO_2$ , la hemoglobina fetal tiene una  $P_{50}$  de en torno a 19 mmHg mientras que la hemoglobina A del adulto tiene una  $P_{50}$  de 26 mmHg. Este sería el caso en el cobaya.



## **CONCLUSIONES**



1. El cobaya posee un cuerpo carotídeo hipotrófico comparado con el de rata y otras especies de experimentación. La exposición a hipoxia crónica no modificó el tamaño del cuerpo carotídeo de cobaya, pero duplicó el de rata.

2. El área tirosina hidroxilasa positiva medida en secciones del cuerpo carotídeo representa un 1% en el cobaya y un 25% en la rata. El porcentaje de células positivas para el mismo enzima presentes en cultivos primarios de cuerpo carotídeo fue del 11% en cobaya y del 45% en la rata.

3. Los parámetros ventilatorios basales en cobaya y rata son comparables. El cobaya no hiperventila en respuesta a la hipoxia aguda (10% O<sub>2</sub>) y el mismo estímulo duplica el volumen minuto en la rata. En ambas especies, la estimulación hipercápnica duplicó el volumen ventilatorio por minuto. Esto implica que, la detección/transducción de la hipoxia a nivel del cuerpo carotídeo, o algún otro elemento del arco reflejo quimiorreceptor responsable de las respuestas ventilatorias a la hipoxia, no son funcionales en el cobaya. La normalidad de la respuesta a la hipercapnia implica que la integración de aferencias del cuerpo carotídeo y de los quimiorreceptores centrales en el centro respiratorio es normal.

4. La exposición del cobaya a hipoxia crónica no indujo la expresión de respuesta ventilatoria a la hipoxia ni sensibilizó la respuesta a la hipercapnia, mientras que en la rata aumentó la respuesta a ambos estímulos. Por tanto, el proceso de aclimatación que produce la hipoxia sostenida y que es mediado por el cuerpo carotídeo no opera en el cobaya.

5. Los cuerpos carotídeos de cobaya y rata son órganos dopaminérgicos, siendo el contenido de dopamina diez veces menor en el de cobaya que en el de rata y su velocidad de síntesis quince veces menor que en el de rata. La exposición a hipoxia crónica aumentó de forma comparable la velocidad de síntesis de catecolaminas en las dos especies.

6. En experimentos *in vitro* ni la hipoxia moderada o intensa, ni el bajo pH, ni los venenos metabólicos activaron la respuesta neurosecretora en las células quimiorreceptoras del cuerpo carotídeo de cobaya, mientras que todos estos estímulos fueron eficaces para activar la neurosecreción en las de rata. Este hallazgo implica que las células quimiorreceptoras del cobaya, origen del reflejo quimiorreceptor para el estímulo hipóxico en el resto de los mamíferos, no son activadas por este estímulo.

## CONCLUSIONES

---

7. La exposición a hipoxia crónica no indujo la expresión de respuestas neurosecretoras a la hipoxia aguda en el cobaya; en la rata, la exposición a hipoxia crónica duplicó las respuestas neurosecretoras. Estos hallazgos demuestran que el proceso de aclimatación es originado en el cuerpo carotídeo y que el cobaya no lo expresa.

8. Los cuerpos carotídeos de ambas especies *in vitro* exhibieron una respuesta neurosecretora al alto  $K^+$  extracelular casi idéntica, ello implicaría que la maquinaria excitotónica en las células quimiorreceptores del cobaya es normal. Por tanto, la incapacidad para responder a la hipoxia puede deberse a que este estímulo no es detectado por las células quimiorreceptoras de cobaya o a que algún elemento específico del acoplamiento estímulo-secreción para el estímulo hipóxico no se expresa en esta especie.

9. Las células quimiorreceptoras de cobaya registradas en cultivos primarios, que responden con un transitorio de calcio en respuesta al alto  $K^+$  extracelular, no responden a la hipoxia, mientras las de rata responden a ambos estímulos.

10. Las células quimiorreceptoras de cobaya y rata poseen densidades de corriente de  $K^+$  dependiente de voltaje de magnitud muy similar. En la rata el 67% de las células expresan componentes sensibles a la hipoxia, en el cobaya sólo lo hacen el 9%. Si calculamos la media ponderada de los resultados de medida de calcio y los de registros de las corrientes de  $K^+$  podríamos concluir que en el cuerpo carotídeo de cobaya <4% de las células son sensibles a la hipoxia y en la rata el porcentaje sería del >92%.

11. El conjunto de nuestros hallazgos indican que la hipoxia no es un estímulo eficaz para las células quimiorreceptoras del cobaya, debido a que las células no expresan "el sensor de  $O_2$ " y/o el factor de acoplamiento entre el sensor y los canales de  $K^+$ .

12. El cobaya es un animal hipotenso e hipoxémico comparado con la rata.

13. La hipoxia aguda *in vivo* genera en el cobaya un perfil de respuestas metabólicas y de niveles de norepinefrina y epinefrina en plasma similares a los que produce en la rata adulta, especie en la que se conoce que las células cromafines no son sensibles a la hipoxia. En experimentos *in vitro* se demuestra que la hipoxia no activa la secreción de catecolaminas en la médula adrenal ni de cobaya ni de rata.

## **REFERENCIAS**





1. Adams, W.E. **The comparative morphology of the carotid body and carotid sinus.** Thomas, Springfield, IL. 1958.
2. Alcayaga J, Varas R, Arroyo J, Iturriaga R, Zapata P. Responses to hypoxia of petrosal ganglia in vitro. **Brain Res.** 1999; 845:28-34.
3. Almaraz L, Gonzalez C, Obeso A. Effects of high potassium on the release of [3H]dopamine from the cat carotid body in vitro. **J Physiol.** 1986; 379:293-307.
4. Anichkov SV, Belen'kii ML. **Pharmacology of the Carotid Body Chemoreceptors.** New York: Macmillan; 1963.
5. Anton AH, Sayre DF A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. **J Pharmacol Exp Ther.** 1962; 138:360-75.
6. Bao L, Avshalumov MV, Patel JC, Lee CR, Miller EW, Chang CJ, Rice ME. Mitochondria are the source of hydrogen peroxide for dynamic brain-cell signaling. **J Neurosci.** 2009; 29:9002-10.
7. Bartsch P, Mairbaurl H, Maggiorini M, Swenson ER. Physiological aspects of high-altitude pulmonary edema. **J Appl Physiol.** 2005; 98:1101-10.
8. Bavis RW, Fallon SC, Dmitrieff EF. Chronic hyperoxia and the development of the carotid body. **Respir Physiol Neurobiol.** 2013; 185:94-104.
9. Berdeaux R, Stewart R. cAMP signaling in skeletal muscle adaptation: hypertrophy, metabolism, and regeneration. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2012; 303:E1-17.
10. Bernareggi M, Rossoni G, Clini E, Pasini E, Bachetti T, Cremona G, Ambrosino N, Berti F. Detection of nitric oxide in exhaled air of different animal species using a clinical chemiluminescence analyser. **Pharmacol Res.** 1999; 39:221-4.
11. Bert P. **Barometric Pressure: Researches in Experimental Physiology.** Traducción de Hitchcock MA y Hitchcock RA. College Book Co., Columbus Ohio, 1943.
12. Biesold D, Kurosawa M, Sato A, Trzebski A. Hypoxia and hypercapnia increase the sympathoadrenal medullary functions in anesthetized, artificially ventilated rats. **Jpn J Physiol.** 1989; 39:511-22.
13. Bigham AW, Wilson MJ, Julian CG, Kiyamu M, Vargas E, Leon-Velarde F, Rivera-Chira M, Rodriquez C, Browne VA, Parra E, Brutsaert TD, Moore LG, Shriver MD. Andean and Tibetan patterns of adaptation to high altitude. **Am J Hum Biol.** 2013; 25:190-7.
14. Bisgard GE. Carotid body mechanisms in acclimatization to hypoxia. **Respir Physiol.** 2000; 121:237-246.
15. Bisgard, GE and Neubauer, JA. *Peripheral and central effects of hypoxia.* En: **Regulation of breathing.** Ed. J.A. Dempsey y A.I. Pack. Marcel Decker, Inc. New York. 1995. pp 617-668.
16. Blake and Banchemero. Effects of cold and hypoxia on ventilation and oxygen consumption in awake guinea pigs. **Respir Physiol.** 1985; 61:357-368.
17. Blanco CE, Hanson MA, Johnson P, Rigatto H. Breathing pattern of kittens during hypoxia. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.** 1984; 56:12-7.
18. Bloom SR, Edwards AV, Hardy RN, Silver M. Adrenal and pancreatic endocrine responses to hypoxia in the conscious calf. **J Physiol.** 1976; 261:271-83.
19. Bloom SR, Edwards AV, Hardy RN. Adrenal and pancreatic endocrine responses to hypoxia and hypercapnia in the calf. **J Physiol.** 1977; 269:131-54.
20. Boddy K, Jones CT, Mantell C, Ratcliffe JG, Robinson JS. Changes in plasma ACTH and corticosteroid of the maternal and fetal sheep during hypoxia. **Endocrinology.** 1974; 94:588-91.
21. Boycott, AE, Haldane JS. The effects of low atmospheric pressures on respiration. **J Physiol** 1908; 37:355-377.
22. Bradford J, Dean H (1894). The pulmonary circulation. **J Physiol.** 1984; 1:34-96.
23. Braunitzer G, Schrank B, Stangl A, Wiesner H. Respiration at high altitudes, phosphate-protein interaction: the sequence of hemoglobins from guinea pig and dromedary (author's transl). **Hoppe Seylers Z Physiol Chem.** 1979; 360:1941-6.

24. Brewster WR Jr, Isaacs JP, Osgood PF, King TL. The hemodynamic and metabolic interrelationships in the activity of epinephrine, norepinephrine and the thyroid hormones. **Circulation**. 1956; 13:1-20.
25. Brimijoin S, Wiermaa MJ. Direct comparison of the rapid axonal transport of norepinephrine and dopamine-beta-hydroxylase activity. **J Neurobiol**. 1977; 8:239-50.
26. Brutsaert TD, Parra E, Shriver M, Gamboa A, Palacios JA, Rivera M, Rodriguez I, León-Velarde F. Effects of birthplace and individual genetic admixture on lung volume and exercise phenotypes of Peruvian Quechua. **Am J Phys Anthropol**. 2004; 123:390-8.
27. Buckler KJ, Williams BA, Honore E. An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. **J Physiol**. 2000; 525:135-142.
28. Buckler KJ. A novel oxygen-sensitive potassium current in rat carotid body type I cells. **J Physiol**. 1997; 498:649-662.
29. Buerk DG, Lahiri S, Chugh D, Mokashi A. Electrochemical detection of rapid DA release kinetics during hypoxia in perfused-superfused cat carotid body. **J Appl Physiol**. 1995; 78:830-7.
30. Bureau MA, Lamarche J, Foulon P, Dalle D. Postnatal maturation of respiration in intact and carotid body-chemodenerivated lambs. **J Appl Physiol (1985)**. 1985; 59:869-74.
31. Caceres AI, Obeso A, Gonzalez C, Rocher A. 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**. 2007; 102:231-45.
32. Campanucci VA, Nurse CA. Autonomic innervation of the carotid body: role in efferent inhibition. **Respir Physiol Neurobiol**. 2007; 157:83-92.
33. Campanucci VA, Nurse CA. Biophysical characterization of whole-cell currents in O<sub>2</sub>-sensitive neurons from the rat glossopharyngeal nerve. **Neuroscience**. 2005; 132:437-5.1
34. Cannon WB. **The Way of an Investigator A Scientist's Experience in Medical Research**. W.W. Norton & Company, Inc., New York, 1945.
35. Chandel NS, Schumacker PT. Cellular oxygen sensing by mitochondria: old questions, new insight. **J Appl Physiol**. 2000; 88:1880-9.
36. Chioocchio SR, Biscardi AM, Tramezzani, GH. 5-hydroxytryptamine in the carotid body of the cat. **Science**. 1967; 158:790-791.
37. Ciriello J, Moreau JM. Systemic administration of leptin potentiates the response of neurons in the nucleus of the solitary tract to chemoreceptor activation in the rat. **Neuroscience**. 2013; 229:88-99.
38. Claybaugh JR, Wade CE, Sato AK, Cucinell SA, Lane JC, Maher JT. Antidiuretic hormone responses to eucapnic and hypocapnic hypoxia in humans. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol**. 1982; 53:815-23.
39. Cogolludo A, Moreno L, Frazziano G, Moral-Sanz J, Menendez C, Castaneda J, Gonzalez C, Villamor E, and Perez-Vizcaino F. Activation of neutral sphingomyelinase is involved in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. **Cardiovasc Res**. 2009; 82:296-302.
40. Coleridge HH, Coleridge JCG, Jordan D. Integration of ventilatory and cardiovascular control systems. En: Crystal RG y West JB. **The Lung: Scientific Foundations**. 2<sup>nd</sup> edition. Lippincott-Raven, New York, NY, USA. 1997. pp. 1839-1859.
41. Colice GL, Ramirez G. Effect of hypoxemia on the renin-angiotensin-aldosterone system in humans. **J Appl Physiol (1985)**. 1985; 58:724-30.
42. Conde SV, Monteiro EC, Rigual R, Obeso A, Gonzalez C. Hypoxic intensity: a determinant for the contribution of ATP and adenosine to the genesis of carotid body chemosensory activity. **J Appl Physiol (1985)**. 2012a; 112:2002-10.
43. Conde SV, Obeso A, Vicario I, Rigual R, Rocher A, González C. Caffeine inhibition of rat carotid body chemoreceptors is mediated by A<sub>2A</sub> and A<sub>2B</sub> adenosine receptors. **J Neurochem**. 2006; 98:616-628.

44. Conde SV, Ribeiro MJ, Obeso A, Rigual R, Monteiro EC, Gonzalez C. Chronic caffeine intake in adult rat inhibits carotid body sensitization produced by chronic sustained hypoxia but maintains intact chemoreflex output. *Mol Pharmacol*. 2012b; 82:1056-65.
45. Cornolo J, Mollard P, Brugniaux JV, Robach P, Richalet JP. Autonomic control of the cardiovascular system during acclimatization to high altitude: effects of sildenafil. *J Appl Physiol (1985)*. 2004; 97:935-40.
46. Cragg PA, Schwenke DO. Role of carotid bodies in the guinea-pig. *Adv Exp Med Biol*. 1996; 410:377-81.
47. Critchley JA, Ellis P, Ungar A. The reflex release of adrenaline and noradrenaline from the adrenal glands of cats and dogs. *J Physiol*. 1980; 298:71-8.
48. Crosfill ML, Widdicombe JG. Physical characteristics of the chest and lungs and the work of breathing in different mammalian species. *J Physiol*. 1961; 158:1-14.
49. Cross, AR, Henderson L, Jones OT, Delpiano MA, Hentschel J, Acker H. Involvement of an NAD(P)H oxidase as a  $Po_2$  sensor protein in the rat carotid body. *Biochem J*. 1990; 272:743-747.
50. Cudkowicz L. Mean pulmonary artery pressure and alveolar oxygen tension in man at different altitudes. *Respiration*. 1970; 27:417-30.
51. Curran AK, O'Halloran KD, Bradford A. Effects of superior laryngeal nerve section on ventilation in neonatal guinea-pigs. *Respir Physiol*. 1995; 101:23-29.
52. De Burgh Daly M, Lambertsen CJ, Schweitzer A. Observations on the volume of blood flow and oxygen utilization of the carotid body in the cat. *J Physiol*. 1954; 125:67-89.
53. De Castro F, Rubio M. The anatomy and innervation of the blood vessels of the carotid body and the role of chemoreceptive reactions in the autoregulation of the blood flow. En: Torrance RW, ed. *Arterial Chemoreceptors*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1968. pp. 267-277.
54. De Castro F. Nuevas observaciones sobre la inervación de la región carotídea. Los quimio y presorreceptores. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid*. 1940; 32:297-384.
55. De Castro F. 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*. 1928; 25:330-380.
56. De Castro, F. Sur la structure et l'innervation de la glande intercarotidienne (glomus caroticum) de l'homme et des mammifères, et sur un nouveau système d'innervation autonome du nerf glossopharyngien. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid*. 1926; 24:365-432.
57. De Kock LL. The intra-glomerular tissues of the carotid body. *Acta Anat (Basel)*. 1954; 21:101-16.
58. Del Rio R, Muñoz C, Arias P, Court FA, Moya EA, Iturriaga R. Chronic intermittent hypoxia-induced vascular enlargement and VEGF upregulation in the rat carotid body is not prevented by antioxidant treatment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011; 301:L702-11.
59. Denjean A, Canet E, Praud JP, Gaultier C, Bureau M. Hypoxia-induced bronchial responsiveness in awake sheep: role of carotid chemoreceptors. *Respir Physiol*. 1991; 83:201-10.
60. Donnelly DF. Chemoreceptor nerve excitation may not be proportional to catecholamine secretion. *J Appl Physiol (1985)*. 1996; 81:657-64.
61. Donnelly DF. Does catecholamine secretion mediate the hypoxia-induced increase in nerve activity? *Biol Signals*. 1995; 4:304-9.
62. Donnelly, D.F. Function of the carotid body intra-utero and in the postnatal period. En: Gonzalez C, ed. *The carotid body chemoreceptors*. Springer-Verlag, Berlin. 1997; pp. 193-2002.
63. Duchon MR, Biscoe TJ. Mitochondrial function in type I cells isolated from rabbit arterial chemoreceptors. *J Physiol*. 1992a; 450:13-31.
64. Duchon MR, Biscoe TJ. Relative mitochondrial membrane potential and  $[Ca^{2+}]_i$  in type I cells isolated from the rabbit carotid body. *J Physiol*. 1992b; 450:33-61.
65. Dwinell MR, Janssen PL, Pizarro J, Bisgard GE. Effects of carotid body hypocapnia during ventilatory acclimatization to hypoxia. *J Appl Physiol (1985)*. 1997; 82:118-24.

66. Eden GJ, Hanson MA. Effects of chronic hypoxia from birth on the ventilatory response to acute hypoxia in the newborn rat. *J Physiol*. 1987; 392:11-19.
67. Eyzaguirre C, Zapata P. A discussion of possible transmitter or generator substances in carotid body chemoreceptors. En: Torrance RW, ed. **Arterial Chemoreceptors**. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1968a. pp. 213-251.
68. Fernández R, Arriagada I, Garrido AM, Larraín C, Zapata P. Ventilatory chemosensory drive in cats, rats and guinea-pigs. *Adv Exp Med Biol*. 2003; 536:489-95.
69. Ferrer E, Peinado VI, Castañeda J, Prieto-Lloret J, Olea E, González-Martín MC, Vega-Agapito MV, Díez M, Domínguez-Fandos D, Obeso A, González C, Barberà JA. Effects of cigarette smoke and hypoxia on pulmonary circulation in the guinea pig. *Eur Respir J*. 2011; 38:617-27.
70. Feuerstein G, Goldstein DS, Ramwell PW, Zerbe RL, Lux WE Jr, Faden AI, Bayorh MA. Cardiorespiratory, sympathetic and biochemical responses to T-2 toxin in the guinea pig and rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985; 232:786-94.
71. Fidone S, Gonzalez C, Yoshizaki K. Effects of hypoxia on catecholamine synthesis in rabbit carotid body in vitro. *J Physiol Lond*. 1982a; 333:81-91.
72. Fidone S, Gonzalez S, Yoshizaki K. Effects of low oxygen on the release of dopamine from the rabbit carotid body in vitro. *J Physiol Lond*. 1982b; 333:93-110.
73. Fidone S, Gonzalez S. Catecholamine synthesis in rabbit carotid body in vitro. *J Physiol Lond*. 1982; 333:69-79.
74. Fidone SJ, Gonzalez C. Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. En: Fishman AP, ed. **Handbook of Physiology. The Respiratory System**. Bethesda: Amer Physiol Soc; 1986. p. 247-312.
75. Fidone SJ, Sato A. Efferent inhibition and antidromic depression of chemoreceptor A-fibers from the cat carotid body. *Brain Res*. 1970; 22:181-93.
76. Fitzgerald RS, Shirahata M. Systemic responses elicited by stimulating the carotid body: primary and secondary mechanisms. En: Gonzalez C, ed. **The Carotid Body Chemoreceptors**. Berlin: Springer-Verlag. 1997. pp 171-191.
77. Frappell PB, León-Velarde F, Rivera-Ch M. Oxygen transport at high altitude –an integrated perspective. Introduction. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007; 158:115-20.
78. Frisancho AR. Developmental adaptation: where we go from here. *Am J Hum Biol*. 2009; 21:694-703.
79. Gallego Martín T, Obeso A, Agapito T., Perez-Vizcaíno F, Gonzalez C. Especificidad del sulfuro de hidrógeno en el control de la respuesta hipóxica del cuerpo carotídeo. **V Jornadas CIBERES**. Palma de Mallorca 16-18 de octubre, 2012b.
80. Gallego-Martin T, Fernandez-Martinez S, Rigual R, Obeso A, Gonzalez C. 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*. 2012; 302:C1128-40.
81. Gauda EB, Bamford O, Gerfen CR. Developmental expression of tyrosine hydroxylase, D2-dopamine receptor and substance P genes in the carotid body of the rat. *Neuroscience*. 1996; 75:969-977.
82. Gauda EB, Carroll JL, Donnelly DF. Developmental maturation of chemosensitivity to hypoxia of peripheral arterial chemoreceptors- Invited article. *Adv Exp Med Biol*. 2009; 648:243-55.
83. Gauda EB, Cooper R, Johnson SM, McLemore GL, Marshall C. Autonomic microganglion cells: a source of acetylcholine in the rat carotid body. *J Appl Physiol*. 2004; 96:384-391.
84. Gauda EB, Lawson EE. Developmental influences on carotid body responses to hypoxia. *Respir Physiol*. 2000; 121:199-208.
85. Gauda EB. Gene expression in peripheral arterial chemoreceptors. *Microsc Res Tech*. 2002; 59:153-7.
86. Ghijsen WE, Leenders AG. Differential signaling in presynaptic neurotransmitter release. *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62:937-54.

87. Ghofrani HA, Reichenberger F, Kohstall MG, Mrosek EH, Seeger T, Olschewski H, Seeger W, Grimminger F. 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.** 2004; 141(3):169-77.
88. Goldstein DS, Eisenhofer G, Kopin IJ. Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. **J Pharmacol Exp Ther.** 2003; 305:800-11.
89. Gomez-Niño A, Agapito MT, Obeso A, Gonzalez C. Effects of mitochondrial poisons on glutathione redox potential and carotid body chemoreceptor activity. **Respir Physiol Neurobiol.** 2009b; 165:104-11.
90. Gomez-Niño A, Obeso A, Baranda JA, Santo-Domingo J, Lopez-Lopez JR, Gonzalez C. MaxiK potassium channels in the function of chemoreceptor cells of the rat carotid body. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2009a; 297:C715-722.
91. Gonzalez C (ed). **The carotid body chemoreceptors.** Springer-Verlag. Berlin 1997.
92. Gonzalez C, Agapito MT, Rocher A, Gomez-Niño A, Rigual R, Castañeda J, Conde SV, Obeso A. A revisit to O<sub>2</sub> sensing and transduction in the carotid body chemoreceptors in the context of reactive oxygen species biology. **Respir Physiol Neurobiol.** 2010; 174:317-30.
93. Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Oxygen and acid chemoreception in the carotid body chemoreceptors. **Trends Neurosci.** 1992; 15:146-153.
94. Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: From natural stimuli to sensory discharges. **Physiol Rev.** 1994; 74:829-898.
95. Gonzalez C, Conde S, Gallego-Martin T, Olea E, Gonzalez-Obeso E, Ramirez M, Yubero S, Agapito MT, Gomez-Niño A, Obeso A, Rigual R, Rocher A. Fernando De Castro and the discovery of the arterial chemoreceptors. **Front. Neuroanat.,** 12 May 2014 | doi: 10.3389/fnana.2014.00025
96. Gonzalez C, Fidone S. Increased release of <sup>3</sup>H-dopamine during low O<sub>2</sub> stimulation of rabbit carotid body in vitro. **Neurosci Lett.** 1977; 6:95-99.
97. Gonzalez C, Rocher A, Zapata P. Arterial chemoreceptors: cellular and molecular mechanisms in the adaptative and homeostatic function of the carotid body **Rev Neurol.** 2003; 36(3):239-54.
98. Gonzalez C, Vaquero LM, Lopez-Lopez J.R., Perez-Garcia MT. Oxygen-sensitive potassium channels in chemoreceptor cell physiology: making a virtue of necessity. **Ann N Y Acad Sci.** 2009; 1177:82-88.
99. Gonzalez C. Sensitivity to physiological hypoxia. En: Weir EK, Lopez-Barneo J, eds. **Oxygen Regulation of Ion Channels and Gene Expression.** New York: Futura Publishing Co, Inc. Armonk; 1998; pp. 321-336.
100. Gonzalez C. **Neurotransmission in the Carotid Body.** PhD Thesis. School of Medicine. University of Valladolid. 1977.
101. Gonzalez-Martín MC. **Chronic sustained and intermittent hypoxia as models of COPD and OSAS.** Tesis Doctoral Facultad de Medicina. Universidad de Valladolid. 2008.
102. Hampf V, Herget J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. **Physiol Rev.** 2000; 80:1337-72.
103. Hanson M, Kumar P. Chemoreceptor function in the fetus and neonate. **Adv Exp Med Biol.** 1994; 360:99-108.
104. Hanson MA, Nye PC, Torrance RW. The exodus of an extracellular bicarbonate theory of chemoreception and the genesis of an intracellular one. En: Belmonte C, Pallot DJ, Acker H, Fidone S, eds. **Arterial Chemoreceptors.** Leicester: Leicester University Press; 1981; pp. 403-416.
105. Hanson G, Gonzalez C, Obeso A, Dinger B, Fidone S. Local regulation of ganglionic activity during stress. En: **Chemoreceptors and Reflexes in Breathing.** Lahiri S et al., eds. Oxford University Press, N.Y. 1989; pp. 37-43.

106. Hartness ME, Brazier SP, Peers C, Bateson AN, Ashford ML, Kemp PJ. Post-transcriptional control of human maxiK potassium channel activity and acute oxygen sensitivity by chronic hypoxia. *J Biol Chem.* 2003; 278:51422-51432.
107. He L, Chen J, Dinger B, Stensaas L, Fidone S. Effect of chronic hypoxia on purinergic synaptic transmission in rat carotid body. *J Appl Physiol.* 2006; 100:157-162.
108. He L, Dinger B, Sanders K, Hoidal J, Obeso A, Fidone S, Gonzalez C. Effect of p47<sup>phox</sup> gene-deletion on reactive oxygen species (ROS) production and oxygen sensing in mouse carotid body chemoreceptor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005; 289:916-924.
109. Heath, D. and Smith, P. **Disease of the Human Carotid Body.** Springer Verlag, Berlin, 1992.
110. Heym C, Kummer W. Immunohistochemical distribution and colocalization of regulatory peptides in the carotid body. *J Electron Microscop Tech.* 1989 ; 12:331-42.
111. Heymans C, Bouckaert JJ, Dautrebande L. 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 delà des poumons. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 1930; 39:400-408.
112. Hill, JR. The oxygen consumption of new-born and adult mammals. Its dependence on the oxygen tension in the inspired air and on the environmental temperature. *J Physiol.* 1992; 149:346-73.
113. Holgert H, Dagerlind A, Hökfelt T, Lagercrantz H. Neuronal markers, peptides and enzymes in nerves and chromaffin cells in the rat adrenal medulla during postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res.* 1994; 83:35-52.
114. Holzbauer M, Sharman DF. The distribution of catecholamines in vertebrates. En: Handbook of experimental Pharmacology, Vol. 33, ed. Blaschko H y Muscholl E. Berlin-Heidelberg-New York: Springer. 1972; pp. 110-185.
115. Hornbein TF. The relationship between stimulus to chemoreceptors and their responses. En: Torrance RW, ed. *Arterial Chemoreceptors.* Blackwell, Oxford. 1968; pp. 65-78
116. Ichikawa H. Innervation of the carotid body: Immunohistochemical, denervation, and retrograde tracing studies. *Microsc Res Tech.* 2002; 59:188-95.
117. Israel AS, Barbella YR, Cubeddu LX. Effects of chemical sympathectomy on the increases in plasma catecholamines and dopamine-beta-hydroxylase induced by forced immobilization and insulin-induced hypoglycemia: origin and fate of plasma dopamine-beta-hydroxylase. *J Pharmacol Exp Ther.* 1982; 221:577-83.
118. Iturriaga R, Alcayaga J, Zapata P. Dissociation of hypoxia-induced chemosensory responses and catecholamine efflux in cat carotid body superfused in vitro. *J Physiol.* 1996; 497:551-64.
119. Josef de Acosta. *Historia Natural y Moral de las Indias.* Edición crítica de Fermin del Pino-Díaz. CSIC, Madrid. 2008; Libro 3, capítulo 9, p. 70.
120. Katz DM, Finley JCW, Erickson JT, Brosenitsch T. Organization and Development of Chemoafferent Input to the Brainstem. En: Gonzalez C, ed. *The Carotid Body Chemoreceptors.* Springer-Verlag Berlin. 1997. pp. 159-170.
121. Kim D, Kim I, Papreck JR, Donnelly DF, Carroll JL. Characterization of an ATP-sensitive K(+) channel in rat carotid body glomus cells. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011b; 177:247-55.
122. Kim D, Papreck JR, Kim I, Donnelly DF, Carroll JL. Changes in oxygen sensitivity of TASK in carotid body glomus cells during early postnatal development. *Respir Physiol Neurobiol.* 2011a; 177:228-35.
123. Kjaer MK. Adrenal Gland: Fight or Flight Implications for Exercise and Sports En: William J, Kraemer WJ y Rogol AD, eds. *The endocrine system in sports and exercise.* International Olympic Committee. Wiley Online Library. 2005; pp194-199.
124. Kleinschmidt T, März J, Jürgens KD, Braunitzer G. Interaction of allosteric effectors with alpha-globin chains and high altitude respiration of mammals. The primary structure of two tylopoda hemoglobins with high oxygen affinity: vicuna (*Lama vicugna*) and alpaca (*Lama pacos*). *Biol Chem Hoppe Seyler.* 1986; 367:153-60.

125. Köhnke D, Schramm M, Daut J. Oxidative phosphorylation in myocardial mitochondria 'in situ': a calorimetric study on permeabilized cardiac muscle preparations. *Mol Cell Biochem.* 1997; 174:101-13.
126. Kondo H, Iwanaga T, Nakajima T. Immunocytochemical study on the localization of neuron-specific enolase and S-100 protein in the carotid body of rats. *Cell Tissue Res.* 1982; 227:291-5.
127. Kondo H. An electron microscopic study on innervation of the carotid body of guinea pig. *J Ultrastruct Res.* 1971; 37:544-62.
128. Kumar P. Systemic effects resulting from carotid body stimulation-Invited article. *Adv Exp Med Biol.* 2009; 648:223-33.
129. Kummer W, Acker H. Cytochrome b558 and hydrogen peroxide production in small intensely fluorescent cells of sympathetic ganglia. *Histochem Cell Biol.* 1997; 107:151-8.
130. Kummer W. Retrograde neuronal labelling and double-staining immunohistochemistry of tachykinin- and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive pathways in the carotid sinus nerve of the guinea pig. *J Auton Nerv Syst.* 1988; 23:131-41.
131. Kummer W. Three types of neurochemically defined autonomic fibres innervate the carotid baroreceptor and chemoreceptor regions in the guinea-pig. *Anat Embryol (Berl).* 1990; 181:477-89.
132. Lack EE. Hyperplasia of vagal and carotid body paraganglia in patients with chronic hypoxemia. *Am J Pathol.* 1978; 91:497-516.
133. Lagercrantz H, Slotkin TA. The "stress" of being born. *Sci Am.* 1986; 254:100-7.
134. Lahiri S, Mulligan E, Nishino T, Mokashi A, Davies RO. Relative responses of aortic body and carotid body chemoreceptors to carboxyhemoglobinemia. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1981; 50:580-6.
135. Lahiri S, Nishino T, Mokashi A, Mulligan E. Relative responses of aortic body and carotid body chemoreceptors to hypotension. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1980; 48:781-8.
136. Lahiri S. Physiological responses and adaptations to high altitude. *Int Rev Physiol.* 1977; 15:217-251.
137. Laidler P, Kay JM. A quantitative morphological study of the carotid bodies of rats living at a simulated altitude of 4300 metres. *J Pathol.* 1975; 117:183-91.
138. Lever JD, Boyd JD. Osmiophile granules in glomus cells of the rabbit carotid body. *Nature London.* 1957; 179:1082-1083.
139. Li Q, Sun B, Wang X, Jin Z, Zhou Y, Dong L, Jiang LH, Rong W. A crucial role for hydrogen sulfide in oxygen sensing via modulating large conductance calcium-activated potassium channels. *Antioxid Redox Signal.* 2010; 12:1179-89.
140. Libet B, Owman C. Concomitant changes in formaldehyde-induced fluorescence of dopamine interneurons and in slow inhibitory post-synaptic potentials of the rabbit superior cervical ganglion, induced by stimulation of the preganglionic nerve or by a muscarinic agent. *J Physiol.* 1974; 237:635-62.
141. Liljestrand G. *Physiology or Medicine 1938 - Presentation Speech* - Nobelprize.org [http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1938/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1938/press.html)
142. Lin X, Lee D, Wu D. Sabiporide improves cardiovascular function and attenuates organ injury from severe sepsis. *J Surg Res.* 2014; 188:231-7.
143. Lopez-Barneo J, Lopez-Lopez JR, Ureña J, Gonzalez C. Chemotransduction in the carotid body: K<sup>+</sup> current modulated by Po<sub>2</sub> in type I chemoreceptor cells. *Science.* 1988; 241:580-582.
144. Lopez-Lopez J, Gonzalez C, Ureña J, Lopez-Barneo J. Low Po<sub>2</sub> selectively inhibits K channel activity in chemoreceptor cells of the mammalian carotid body. *J Gen Physiol.* 1989; 93:1001-1015.
145. López-López JR, González C, Pérez-García MT. Properties of ionic currents from isolated adult rat carotid body chemoreceptor cells: effect of hypoxia. *J Physiol.* 1997; 499:429-41.

## REFERENCIAS

---

146. Lopez-Lopez JR, Gonzalez C. Time course of K<sup>+</sup> current inhibition by low oxygen in chemoreceptor cells of adult rabbit carotid body: effects of carbon monoxide. *FEBS Lett.* 1992; 299: 251-254.
147. Lübbers DW, Teckhaus L, Seidl E. Capillary distances and oxygen supply to the specific tissue of the carotid body. In: Acker H, Fidone S, Eyzaguirre C, Lübbers DW, Torrance RW, eds. **Chemoreception in the Carotid Body.** Berlin: Springer-Verlag, 1977: p.62-68.
148. Marion F. **Wonderful Balloon Ascents; Or The Conquest Of The Skies.** World Wide School Library, Part III, Chapter 2. 2004; pp.126-128. <http://www.gutenberg.org/files/899/899-h/899-h.htm>
149. Marshall BE, Hanson CW, Frasch F, Marshall C. Role of hypoxic pulmonary vasoconstriction in pulmonary gas exchange and blood flow distribution. 2. Pathophysiology. *Intensive Care Med.* 1994; 20:379-389.
150. Marshall BE, Marshall C, Frasch F, Hanson CW. Role of hypoxic pulmonary vasoconstriction in pulmonary gas exchange and blood flow distribution. 1. Physiologic concepts. *Intensive Care Med.* 1994; 20:291-297.
151. McCartney CE, McClafferty H, Huibant JM, Rowan EG, Shipston MJ, Rowe IC. A cysteine-rich motif confers hypoxia sensitivity to mammalian large conductance voltage- and Ca-activated K (BK) channel alpha-subunits. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102:17870-1786.
152. Mills E, Jöbsis FF. Mitochondrial respiratory chain of carotid body and chemoreceptor response to changes in oxygen tension. *J Neurophysiol.* 1972; 35:405-28.
153. Mills E, Jöbsis FF. Simultaneous measurement of cytochrome a3 reduction and chemoreceptor afferent activity in the carotid body. *Nature.* 1970; 225:1147-9.
154. Mir AK, Al-Neamy K, Pallot DJ, Nahorski SR. Catecholamines in the carotid body of several mammalian species: effects of surgical and chemical sympathectomy. *Brain Res.* 1982; 252:335-42.
155. Mkrtchian S, Kählin J, Ebberyd A, Gonzalez C, Sanchez D, Balbir A, Kostuk EW, Shirahata M, Fagerlund MJ, Eriksson LI. The human carotid body transcriptome with focus on oxygen sensing and inflammation--a comparative analysis. *J Physiol.* 2012; 590:3807-19.
156. Monge C, León-Velarde F. Physiological adaptation to high altitude: oxygen transport in mammals and birds. *Physiol Rev.* 1992; 71:1135-1172.
157. Mortola JP, Frappell PB. Ventilatory responses to changes in temperature in mammals and other vertebrates. *Annu Rev Physiol.* 2000; 62:847-74.
158. Mortola JP. **Respiratory Physiology of Newborn Mammals: A Comparative Perspective.** The Johns Hopkins University Press, Baltimore, USA, 2001.
159. Mulligan E, Lahiri S, Storey BT. Carotid body O<sub>2</sub> chemoreception and mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 1981; 51:438-46.
160. Nadel JA, Widdicombe JG. Effect of changes in blood gas tensions and carotid sinus pressure on tracheal volume and total lung resistance to airflow. *J Physiol.* 1962;163:13-33.
161. Necas E, Neuwirt J, Gross J. Species specificity of guinea pig erythropoietin. *Endocrinol Exp.* 1976; 10:303-11.
162. Neil E, O'Regan RG. Efferent and afferent impulse activity in the "intact" sinus nerve. *J Physiol.* 1969; 205:20P-21P.
163. Nishi K, Stensaas LJ. The ultrastructure and source of nerve endings in the carotid body. *Cell Tissue Res.* 1974; 154:303-319.
164. Nurse CA. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms at peripheral arterial chemoreceptors. *Exp Physiol.* 2010; 95:657-67.
165. Obeso A, Almaraz L, Gonzalez C. Correlation between adenosine triphosphate levels, dopamine release and electrical activity in the carotid body: support for the metabolic hypothesis of chemoreception. *Brain Res.* 1985; 348:64-68.
166. Obeso A, Almaraz L, Gonzalez C. Effects of cyanide and uncouplers on chemoreceptor activity and ATP content of the cat carotid body. *Brain Res.* 1989a; 481:250-257.



167. Obeso A, Gonzalez C, Dinger B, Fidone S. Metabolic activation of carotid body glomus cells by hypoxia. *J Appl Physiol*. 1989b; 67:484-487.
168. Obeso A, Gonzalez C, Rocher A. Mecanismos de quimiorrepción en el cuerpo carotídeo. En: **Estudio de la Función Respiratoria: Control de la Respiración**. Ed. Francisco García Rio. Sanitaria 2000. Barcelona-Madrid, 2006. pp. 29-61.
169. Obeso A, Rocher A, Fidone S, Gonzalez C. The role of dihydropyridine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels in stimulus-evoked catecholamine release from chemoreceptor cells of the carotid body. *Neuroscience*. 1992; 47:463-72.
170. Obeso A, Rocher A, Herreros B, Gonzalez C. Oxygen consumption and energy metabolism of the carotid body. En: Gonzalez C, ed. **The Carotid Body Chemoreceptors**. New York: Springer-Verlag. 1997b; pp. 31-45.
171. Obeso A. **Hipótesis metabólica de quimiotransducción: hechos experimentales** (Tesis Doctoral). Valladolid: Universidad de Valladolid, 1984.
172. Olea E, Ferrer E, Prieto-Lloret J, Gonzalez-Martin C, Vega-Agapito V, Gonzalez-Obeso E, Agapito T, Peinado V, Obeso A, Barbera JA, Gonzalez C. Effects of cigarette smoke and chronic hypoxia on airways remodeling and resistance. Clinical significance. *Respir Physiol Neurobiol*. 2011; 179: 305-13.
173. Ortega-Sáenz P, Levitsky KL, Marcos-Almaraz MT, Bonilla-Henao V, Pascual A, López-Barneo J. Carotid body chemosensory responses in mice deficient of TASK channels. *J Gen Physiol*. 2010; 135:379-92.
174. Ortega-Sáenz P, Pardal R, Levitsky K, Villadiego J, Muñoz-Manchado AB, Durán R, Bonilla-Henao V, Arias-Mayenco I, Sobrino V, Ordóñez A, Oliver M, Toledo-Aral JJ, López-Barneo J. Cellular properties and chemosensory responses of the human carotid body. *J Physiol*. 2013 ; 591:6157-73.
175. Pairet B, Jaenicke E. Structure of the altitude adapted hemoglobin of guinea pig in the R2-state. *PLoS One*. 2010; 5:e12389.
176. Pardal R, López-Barneo J. Neural stem cells and transplantation studies in Parkinson's disease. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 741:206-16.
177. Pardal R, Ortega-Sáenz P, Durán R, López-Barneo J. Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell*. 2007; 131:364-77.
178. Pasaro R, Ribas J. Physiopathology of the Carotid Body and its Role I the Development of Sudden Infant Death Syndrome. En: Gonzalez C, ed. **The Carotid Body Chemoreceptors**. Springer-Verlag, Berlin, 1997; pp. 203-218.
179. Peasley MA, Shi R. Resistance of isolated mammalian spinal cord white matter to oxygen-glucose deprivation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002; 283:C980-9.
180. Peers C, Carpenter E, Hatton CJ, Wyatt CN, Bee D. Ca<sup>2+</sup> channel currents in type I carotid body cells of normoxic and chronically hypoxic neonatal rats. *Brain Res*. 1996; 739:251-7.
181. Peers C. Hypoxic suppression of K<sup>+</sup> currents in type I carotid body cells: selective effect on the Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current. *Neurosci Lett*. 1990; 119:253-256.
182. Peng YJ, Nanduri J, Raghuraman G, Souvannakitti D, Gadalla MM, Kumar GK, Snyder SH, Prabhakar NR. H<sub>2</sub>S mediates O<sub>2</sub> sensing in the carotid body. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107:10719-24.
183. Pérez-García MT, Almaraz L, González C. Effects of different types of stimulation on cyclic AMP content in the rabbit carotid body: functional significance. *J Neurochem*. 1990; 55:1287-93.
184. Perez-Garcia MT, Lopez-Lopez JR, Gonzalez C. Kvβ1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O<sub>2</sub> sensitivity to Kv4.2 but not to Shaker channels. *J Gen Physiol*. 1997; 13:897-907.
185. Perez-Garcia MT, Lopez-Lopez JR, Riesco A M, Hoppe U, Gonzalez C, Marban E, Johns DC. Suppression of transient outward K<sup>+</sup> currents in chemoreceptor cells of the rabbit carotid body by viral gene transfer of inducible dominant negative Kv4.3 constructs. *J Neurosci*. 2000; 20:5689-5695.
186. Pflüger E. Ueber die ursacheder athembewegungen, sowie der dyspnoë und apnoë. *Pflugers*

- Arch. Gesamte Physiol. Meschen Tiere.** 1868; 1:61-106.
187. Prabhakar NR, Semenza GL. Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. **Physiol Rev.** 2012; 92:967-1003
188. Prasad M, Fearon IM, Zhang M, Laing M, Vollmer C, Nurse CA. Expression of P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat carotid body afferent neurones: role in chemosensory signalling. **J Physiol.** 2001; 537:667-677.
189. Prieto-Lloret J, Cáceres AI, Obeso A, Rocher A, Rigual R, Agapito MT, Bustamante R, Castaneda J, Pérez-García MT, López-López JR, González C. Ventilatory responses and carotid body function in adult rats perinatally exposed to hyperoxia. **J Physiol.** 2004; 554:126-144.
190. Prieto-Lloret J, Donnelly DF, Rico AJ, Moratalla R, González C, Rigual RJ. Hypoxia transduction by carotid body chemoreceptors in mice lacking dopamine D(2) receptors. **J Appl Physiol (1985).** 2007; 103:1269-75.
191. Prieto-Lloret J, Ramirez M, Olea L, Moral-Sanz J, Cogolludo A, Castañeda J., Agapito T, Gomez-Niño A, Rocher A, Rigual R, Perez-Vizcaino F, Obeso A, Gonzalez C. Hypoxic pulmonary vasoconstriction is lost in rats perinatally exposed to hyperoxia. **J. Physiol.** 2014, (submitted).
192. Quintero M, Gonzalez-Martin Mdel C, Vega-Agapito V, Gonzalez C, Obeso A, Farré R, Agapito T, Yubero S. The effects of intermittent hypoxia on redox status, NF-κB activation, and plasma lipid levels are dependent on the lowest oxygen saturation. **Free Radic Biol Med.** 2013; 65:1143-54.
193. Raff H, Shinsako J, Keil LC, Dallman MF. Vasopressin, ACTH, and corticosteroids during hypercapnia and graded hypoxia in dogs. **Am J Physiol.** 1983; 244:E453-8.
194. Raff H, Tzankoff SP, Fitzgerald RS. ACTH and cortisol responses to hypoxia in dogs. **J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.** 1981; 51:1257-60.
195. Ramirez M, Gallego-Martin T, Olea E, Rocher A, Obeso A, Gonzalez C. Serotonin dynamics and actions in the rat carotid body: preliminary findings. **Adv Exp Med Biol.** 2012; 758:255-63.
196. Reeves SR, Gozal E, Guo SZ, Sachleben LR Jr, Brittan KR, Lipton AJ, Gozal D. Effect of long-term intermittent and sustained hypoxia on hypoxic ventilatory and metabolic responses in the adult rat. **J Appl Physiol (1985).** 2003; 95:1767-74.
197. Reinafarje B. Myoglobin content and enzymatic activity of muscle and altitude adaptation. **J Appl Physiol.** 1962; 17:301-305.
198. Reissmann KR. Studies on the Mechanism of Erythropoietic Stimulation in Parabolic Rats During Hypoxia. **Blood.** 1950; 5:372-380.
199. Richalet JP, Gratadour P, Robach P, Pham I, Dechaux M, Joncquiert-Latarjet A, Mollard P, Brugniaux J, Cornolo J. Sildenafil inhibits altitude-induced hypoxemia and pulmonary hypertension. **Am J Respir Crit Care Med.** 2005; 171:275-81.
200. Rico A, **Quimiosensibilidad de la médula adrenal neonatal.** Un estudio in vitro. Tesis Doctoral. Universidad de Valladolid, 2006.
201. Rico AJ, Prieto-Lloret J, Gonzalez C, Rigual R. Hypoxia and acidosis increase the secretion of catecholamines in the neonatal rat adrenal medulla: an in vitro study. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2005; 289:C1417-C1425.
202. Riesco-Fagundo A., Pérez-García MT, Gonzalez C, López-López JR. O<sub>2</sub> modulates large-conductance Ca<sup>2+</sup>-dependent K<sup>+</sup> channels of rat chemoreceptor cells by a membrane-restricted and CO-sensitive mechanism. **Circ. Res.** 2001; 89:430-436.
203. Rigual R, Gonzalez E, Fidone S, Gonzalez C. Effects of low pH on synthesis and release of catecholamines in the cat carotid body in vitro. **Brain Res.** 1984; 309:178-81.
204. Rigual R, Iñiguez C, Carreres C, Gonzalez C. Carbonic anhydrase in the carotid body and the carotid sinus nerve. **Histochemistry.** 1985; 82:577-580.
205. Rigual R, Rico AJ, Prieto-Lloret J, de Felipe C, González C, Donnelly DF. Chemoreceptor activity is normal in mice lacking the NK1 receptor. **Eur J Neurosci.** 2002; 16:2078-84.

206. Rigual R, Rico AJ, Prieto-Lloret J, de Felipe C, González C, Donnelly DF. Chemoreceptor activity is normal in mice lacking the NK1 receptor. *Eur J Neurosci*. 2002; 16:2078-84.
207. Rocher A, Cáceres AI, Obeso A, Gonzalez C. Tetrodotoxin as a tool to elucidate sensory transduction mechanisms: the case for the arterial chemoreceptors of the carotid body. *Mar Drugs*. 2011; 9(12):2683-704.
208. Rocher A, Geijo-Barrientos E, Cáceres AI, Rigual R, González C, Almaraz L. Role of voltage-dependent calcium channels in stimulus-secretion coupling in rabbit carotid body chemoreceptor cells. *J Physiol*. 2005; 562:407-20.
209. Rocher A, Obeso A, Herreros B, Gonzalez C. Activation of the release of dopamine in the carotid body by veratridine. Evidence for the presence of voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels in type I cells. *Neurosci Lett*. 1988; 94:274-8.
210. Rocher A, Obeso A, Gonzalez C, Herreros B. Ionic mechanisms for the transduction of acidic stimuli in rabbit carotid body glomus cells. *J Physiol Lond*. 1991; 433:533-548.
211. Rong W, Gourine AV, Cockayne DA, Xiang Z, Ford AP, Spyer KM, Burnstock G. Pivotal role of nucleotide P2X2 receptor subunit of the ATP-gated ion channel mediating ventilatory responses to hypoxia. *J Neurosci*. 2003; 23:11315-11321.
212. Ross FA, Rafferty JN, Dallas ML, Ogunbayo O, Ikematsu N, McClafferty H, Tian L, Widmer H, Rowe IC, Wyatt CN, Shipston MJ, Peers C, Hardie DG, Evans AM. Selective expression in carotid body type I cells of a single splice variant of the large conductance calcium- and voltage-activated potassium channel confers regulation by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2011; 286:11929-36.
213. Rubin LJ, Naeije R. Sildenafil for enhanced performance at high altitude? *Ann Intern Med*. 2004; 141:233-5.
214. Sant'Ambrogio G Receptors and Reflexes of the Respiratory Tract. En: Bitar EE, ed. *Pulmonary Biology in Health and Disease*. Springer, NY. 2002; pp.77-93.
215. Scheffers IJ, Kroon AA, de Leeuw PW. Carotid baroreflex activation: past, present, and future. *Curr Hypertens Rep*. 2010; 12:61-6.
216. Scherrer U, Vollenweider L, Delabays A, Savcic M, Eichenberger U, Kleger GR, Fikrle A, Ballmer PE, Nicod P, Bäertsch P. Inhaled nitric oxide for high-altitude pulmonary edema. *N Engl J Med*. 1996; 334(10):624-9.
217. Schwenke DO, Bolter CP, Cragg PA Are the carotid bodies of the guinea-pig functional? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007; 146:180-188.
218. Schwenke DO, Bolter CP, Cragg PA. Are the carotid bodies of the guinea-pig functional? *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007; 146:180-8.
219. Schwenke DO, Cragg PA. Carotid bodies and the sigh reflex in the conscious and anaesthetised guinea-pig. *Adv Exp Med Biol*. 2000; 475:801-13.
220. Schwenke DO, Cragg PA. Comparison of the depressive effects of four anesthetic regimens on ventilatory and cardiovascular variables in the guinea pig. *Comp Med*. 2004; 54:77-85.
221. Seidler FJ, Slotkin TA Adrenomedullary function in the neonatal rat: responses to acute hypoxia. *J Physiol*. 1985; 358:1-16.
222. Seidler FJ, Slotkin TA. Ontogeny of adrenomedullary responses to hypoxia and hypoglycemia: role of splanchnic innervation. *Brain Res Bull*. 1986; 16:11-14.
223. Semenza GL. Regulation of physiological responses to continuous and intermittent hypoxia by hypoxia-inducible factor 1. *Exp Physiol*. 2006; 91:803-6.
224. Singer D. Neonatal tolerance to hypoxia: a comparative-physiological approach. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 1999; 123:221-34.
225. Slotkin TA, Seidler FJ. Adrenomedullary catecholamine release in the fetus and newborn: secretory mechanisms and their role in stress and survival. *J Dev Physiol*. 1988; 10:1-16.
226. Spyer KM, Dale N, Gourine AV. ATP is a key mediator of central and peripheral chemosensory transduction. *Exp Physiol*. 2004; 89:53-59.

227. Stea A, Nurse CA. Whole-cell currents in two subpopulations of cultured rat petrosal neurons with different tetrodotoxin sensitivities. *Neuroscience*. 1992; 47:727-36.
228. Stopka T, Zivny JH, Goldwasser E, Prchal JF, Necas E, Prchal JT. Guinea pig serum erythropoietin (EPO) selectively stimulates guinea pig erythroid progenitors: human or mouse erythroid progenitors do not form erythroid burst-forming unit colonies in response to guinea pig serum EPO. *Exp Hematol*. 1998; 26:910-4.
229. Storz JF, Moriyama H. Mechanisms of hemoglobin adaptation to high altitude hypoxia. *High Alt Med Biol*. 2008; 9:148-57.
230. Stratakis CA. New genes and/or molecular pathways associated with adrenal hyperplasias and related adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol*. 2009; 300:152-7.
231. Swenson ER. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *High Alt Med Biol*. 2013;14:101-10.
232. Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev*. 2012; 92:367-520.
233. Taylor CT, Moncada S. Nitric oxide, cytochrome C oxidase, and the cellular response to hypoxia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010; 30:643-7.
234. Timmers HJ, Wieling W, Karemaker JM, Lenders JW. Denervation of carotid baro- and chemoreceptors in humans. *J Physiol*. 2003; 553:3-11.
235. Tipoe GL, Fung ML. Expression of HIF-1alpha, VEGF and VEGF receptors in the carotid body of chronically hypoxic rat. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003; 138:143-54.
236. Torrance RW. Arterial Chemoreceptors. En: Widdicombe JG, ed. *Respiratory Physiology*. Baltimore: University Park Press; 1974; pp. 247-271.
237. Turek Z, Ringnald BE, Morán O, Kreuzer F. Oxygen transport in guinea pigs native to high altitude (Junin, Peru, 4,105 m). *Pflugers Arch*. 1980; 384:109-15.
238. Turner PJ, Buckler KJ. Oxygen and mitochondrial inhibitors modulate both monomeric and heteromeric TASK-1 and TASK-3 channels in mouse carotid body type-1 cells. *J Physiol*. 2013; 591:5977-98.
239. Turner PJ, Buckler KJ. Oxygen and mitochondrial inhibitors modulate both monomeric and heteromeric TASK-1 and TASK-3 channels in mouse carotid body type-1 cells. *J Physiol*. 2013; 591:5977-98.
240. Varas R, Wyatt CN, Buckler KJ. Modulation of TASK-like background potassium channels in rat arterial chemoreceptor cells by intracellular ATP and other nucleotides. *J Physiol*. 2007; 583:521-36.
241. Verna A, Talib N, Roumy M, Pradet A. Effects of metabolic inhibitors and hypoxia on the ATP, ADP and AMP content of the rabbit carotid body in vitro: the metabolic hypothesis in question. *Neurosci Lett*. 1990; 116:156-161.
242. Verna A, Talib N, Roumy M, Pradet A. Effects of metabolic inhibitors and hypoxia on the ATP, ADP and AMP content of the rabbit carotid body in vitro: the metabolic hypothesis in question. *Neurosci Lett*. 1990; 116:156-61.
243. Verna A. The mammalian carotid body: Morphological data. En: Gonzalez C, ed. *The Carotid Body Chemoreceptors*. Springer-Verlag, New York. 1997. pp. 1-30.
244. Viault F. Sur l'augmentation considérable du nombre des globules rouges dans le sang chez les habitants des hauts plateaux de l'Amérique du Sud. *C R Acad Sci Paris*. 1890; 111:917-918.
245. Vicario I, Obeso A, Rocher A, López-Lopez JR, González C. Intracellular Ca<sup>2+</sup> stores in chemoreceptor cells of the rabbit carotid body: significance for chemoreception. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000a; 279:C51-61.
246. Vicario I, Rigual R, Obeso A, Gonzalez C. Characterization of the synthesis and release of catecholamine in the rat carotid body in vitro. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000b; 278:C490-9.
247. Von Euler US, Liljestrand G. Observations on the pulmonary arterial pressure in the cat. *Acta Physiol Scand*. 1946; 22:115-1123.

248. Wajcman H, Galactéros F. Hemoglobins with high oxygen affinity leading to erythrocytosis. New variants and new concepts. *Hemoglobin*. 2005; 29:91-106.
249. Wang ZY, Bisgard GE. Chronic hypoxia-induced morphological and neurochemical changes in the carotid body. *Microsc Res Tech*. 2002; 59:168-77.
250. Wang ZZ, Stensaas LJ, Bredt DS, Dinger BG, Fidone SJ. Mechanisms of carotid body inhibition. *Adv Exp Med Biol*. 1994; 360:229-235.
251. Wang ZZ, Stensaas LJ, Dinger BG, Fidone SJ. Nitric oxide mediates chemoreceptor inhibition in the cat carotid body. *Neuroscience* 1995; 65: 217-29.
252. Ward MP, Milledge JS, West JB. *High Altitude Medicine and Physiology*. 2nd edition. London, UK. Chapman and Hall Medical. 1995
253. Weber RE. High-altitude adaptations in vertebrate hemoglobins. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007; 158:132-42.
254. West JB. American medical research expedition to Everest. *High Alt Med Biol*. 2010;11:103-10.
255. Wiester MJ, Tepper JS, King ME, Ménache MG, Costa DL. Comparative study of ozone (O<sub>3</sub>) uptake in three strains of rats and in the guinea pig. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1988; 96:140-6.
256. Wiester MJ, Tepper JS, Weber MF, Ménache MG. Histamine and methacholine aerosol bronchial challenge in awake guinea pigs. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990; 253:27-33.
257. Willems JL, Buylaert WA, Lefebvre RA, Bogaert MG. Neuronal dopamine receptors on autonomic ganglia and sympathetic nerves and dopamine receptors in the gastrointestinal system. *Pharmacol Rev*. 1985;37:165-216.
258. Williams SE, Wootton P, Mason HS, Bould J, Iles DE, Riccardi D, Peers C, Kemp PJ. Hemoxygenase-2 is an oxygen sensor for a calcium-sensitive potassium channel. *Science* 2004; 306:2093-2097.
259. Winder CV. On the mechanisms of stimulation of carotid gland chemoreceptor. *Am J Physiol* 1937; 118: 389-398.
260. Winslow RM. The role of hemoglobin oxygen affinity in oxygen transport at high altitude. *Respir Physiol Neurobiol*. 2007;158:121-7.
261. Wong DL. Why is the adrenal adrenergic? *Endocr Pathol*. 2003; 14:25-36.
262. Wong DL. Epinephrine biosynthesis: hormonal and neural control during stress. *Cell Mol Neurobiol*. 2006; 26:891-900.
263. Wright JL, Tai H, Churg A. Vasoactive mediators and pulmonary hypertension after cigarette smoke exposure in the guinea pig. *J Appl Physiol (1985)*. 2006; 100:672-8.
264. Wu M, Haxhiu MA, Johnson SM. Hypercapnic and hypoxic responses require intact neural transmission from the pre-Bötzinger complex. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005; 146:33-46.
265. Wyatt CN, Wright C, Bee D, Peers C. O<sub>2</sub>-sensitive K<sup>+</sup> currents in carotid body chemoreceptor cells from normoxic and chronically hypoxic rats and their roles in hypoxic chemotransduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995; 92: 295-9.
266. Xu F, Gu QH, Zhou T, Lee LY. Acute hypoxia prolongs the apnea induced by right atrial injection of capsaicin. *J Appl Physiol (1985)*. 2003; 94:1446-54.
267. Yamamoto Y, Kummer W, Atoji Y, Suzuki Y. TASK-1, TASK-2, TASK-3 and TRAAK immunoreactivities in the rat carotid body. *Brain Res*. 2002; 950:304-307.
268. Yilmaz C, Hogg DC, Ravikumar P, Hsia CC Ventilatory acclimatization in awake guinea pigs raised at high altitude. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005; 145:235-242.
269. Yilmaz C, Johnson RL Jr, Hsia CC. A rebreathing method for measuring lung volume, diffusing capacity and cardiac output in conscious small animals. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005b; 146:215-23.
270. Yilmaz C, Dane DM, Hsia CC. Assessing recruitment of lung diffusing capacity in exercising guinea pigs with a rebreathing technique. *J Appl Physiol (1985)*. 2008; 105:316-21.

## REFERENCIAS

---

271. Yilmaz C, Dane DM, Ravikumar P, Unger RH, Hsia CC. Noninvasive assessment of alveolar microvascular recruitment in conscious non-sedated rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2014; 190:105-12.
272. Zapata P. Chemosensory activity in the carotid nerve: Effects of physiological variables. En: Gonzalez C, ed. *The Carotid Body Chemoreceptors.* New York: Springer-Verlag; 1997; pp. 97-117.
273. Zhang M, Zhong H, Vollmer C, Nurse CA. Co-release of ATP and ACh mediates hypoxic signalling at rat carotid body chemoreceptors. *J Physiol.* 2000; 525:143-58.
274. Zhuang J, Droma T, Sun S, Janes C, McCullough RE, McCullough RG, Cymerman A, Huang SY, Reeves JT, Moore LG. Hypoxic ventilatory responsiveness in Tibetan compared with Han residents of 3,658 m. *J Appl Physiol (1985).* 1993; 74:303-11.



