

PONTIFICA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS



LA NITRACIÓN DE PROTEÍNAS CONTRIBUYE A LA POTENCIACIÓN QUIMIOSENSORIAL DEL CUERPO CAROTÍDEO DE RATAS SOMETIDAS A HIPOXIA INTERMITENTE

Tesis entregada a la Pontificia Universidad Católica de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor en ciencias biológicas con mención en Ciencias Fisiológicas.

ESTEBAN ALEXIS MOYA CESPEDES

Laboratorio de Neurobiología
Departamento de Fisiología
Pontificia Universidad Católica de Chile

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Rodrigo Iturriaga Agüera
Departamento de Fisiología
Facultad de Ciencias Biológicas
Pontificia Universidad Católica de Chile

Octubre
2013

DEDICATORIA

A mis padres Juan Carlos y Mary,
a mi hermano Carlos
a mi señora María Fernanda.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia más cercana, a mi señora María Fernanda por darme el apoyo y empuje necesario para concretar mi proyecto, y espero que este sea el primero de otros grandes proyectos que concretaremos como una nueva familia desde ahora y en los años futuros. A mi madre María Céspedes, porque siempre me haz dado diez veces más que la ayuda que solicito, porque, sobre todo en los días más agitados, me haz dado la tranquilidad pero también el espacio que necesito velando siempre por lo que es lo mejor para mi. A mi padre Juan Carlos por acompañarme siempre desde donde estés y por seguir dándome lecciones hasta el día de hoy, aunque sea a porrazos. A mi hermano Carlos por compartir sus opiniones y experiencias, y guiarme acerca de las prioridades correctas cada vez que estuve desorientado. A mis sobrinos Luciano y Vicente, por darme muchas alegrías en el proceso, dándome la sonrisa más franca, y por acercarme a la familia cuando a veces me alejaba.

A mi mentor, Dr. Rodrigo Iturriaga, por darme toda su experiencia y guía, por impulsar siempre a que tuviera mis objetivos claros y que los fuera alcanzando de manera convincente y concreta, y por las largas conversaciones en las que ambos, con no poca porfía, definimos las líneas de esta Tesis. Por mostrarme el mundo científico desde todas sus aristas y brindarme todas las oportunidades para que lograra avanzar en mi desarrollo intelectual y personal.

Felicitar a Paulina Arias por los merecidos premios recibidos este año y agradecer su asistencia en todos los procesos experimentales necesarios, como siempre, en todo lo que se relaciona con las muestras histológicas y las técnicas de microscopía, pero además darte mis profundos agradecimientos porque siempre estuviste con la mejor disposición y la mejor sonrisa incluso cuando mi genio no me acompañaba tanto.

Al Dr. Julio Alcayaga, pues diseñó, desarrolló y construyó personalmente los equipos para realizar el protocolo de hipoxia intermitente crónica, sin los cuales hubiera sido imposible elaborar ninguno de los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral. Y por el consejo y conversación sincera que siempre tuvo mientras lo asistía en la elaboración de estos equipos y algunos cafés.

A don Fidel Flores por su indispensable trabajo en el manejo y mantención de los animales con un nivel de compromiso admirable, estando siempre atento a cualquier problema en el desarrollo de los experimentos. Por su compañía y ayuda en los procedimientos quirúrgicos, cuando más lo necesité, y las charlas reanimadoras cuando algo andaba mal.

Quiero agradecer de manera muy especial a mi cuñada María Soledad Gálvez y a mis queridos amigos Catalina González y Jovan Kuzmicic, porque de la manera más generosa me dieron la tranquilidad que yo necesitaba para poder escribir esta Tesis entendiendo y compartiendo la difícil situación en la que estaba.

Y quiero darles las gracias a mis colegas y amigos, pero especialmente a María Francisca Godoy y Felipe Muñoz por acompañarme y ayudarme a resolver mis decisiones y reflexiones y por hacer muy gratos todos estos años.

INDICE GENERAL

	Páginas
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice general	iv
Índice de figuras y tablas	vi
Abreviaturas	viii
Resumen	ix
Abstract	xii
1. Introducción	1
1.1. Apnea obstructiva del sueño	1
1.2. La hipoxia intermitente crónica es el principal responsable de las consecuencias cardiovasculares de OSA.....	2
1.3. El cuerpo carotídeo es el principal sensor de oxígeno.....	4
1.4. Potenciación de la actividad quimiosensorial del cuerpo carotídeo.....	9
1.5. Rol del óxido nítrico en el CB.....	12
1.6. Las ROS contribuyen a los cambios generados en el CB en respuesta a CIH.....	13
1.7. La formación de 3-nitrotirosinas en el CB tiene un posible rol fisiológico.....	18
1.8. Superóxido dismutasa en el CB.....	19
1.9. Propuesta.....	24
2. Hipótesis y objetivos	27
2.1. Hipótesis	27
2.2. Objetivos	28
3. Métodos	29
3.1. Animales	29
3.1.1. Modelo de hipoxia intermitente crónica en ratas.....	29
3.1.2. Utilización de antioxidantes	30
3.2. Registro de la descarga quimiosensorial del CB de rata <i>in situ</i>	31
3.3. Análisis de <i>Western blot</i>	32
3.3.1. Co-inmunoprecipitación de MnSOD nitrada.....	33

3.4. Preparación de los tejidos para inmunohistoquímica	34
3.4.1. Cuantificación de la inmunorreactividad positiva	35
3.5. Cuantificación del NO producido por los CBs.....	36
3.6. Medición de la actividad de MnSOD	36
3.7. Análisis estadístico.....	37
4. Resultados.....	38
4.1. Medición de los niveles de SOD.....	38
4.1.1. Niveles de SOD en glándulas adrenales.....	38
4.1.2. Cuantificación de los niveles de SOD en cuerpos carotídeos.....	43
4.1.3. Medición de MnSOD en ganglio cervical superior.....	49
4.2. Cuantificación del estado redox en ratas sometidas a CIH.....	53
4.2.1. Medición de los niveles de óxido nítrico en homogenizados de CB.....	53
4.2.2. Detección de proteínas nitradas en la médula adrenal y en el cuerpo carotídeo.....	55
4.3. Actividad de MnSOD en las células cromafines de ratas expuestas a CIH.....	58
4.3.1. Medición de la actividad de MnSOD en médulas adrenales y CBs de ratas sometidas a CIH.....	58
4.3.2. La exposición a CIH produce nitración de la MnSOD	62
4.4. Estudio del efecto de CIH sobre la descarga quimiosensorial del CB.....	66
4.4.1. Curso temporal de la descarga quimiosensorial del CB.....	66
4.4.2. Contribución de las ROS mitocondriales y del radical ONOO ⁻ sobre la descarga quimiosensorial.....	71
4.4.3. El tratamiento con Ebselen revierte la hipertensión inducida por CIH.....	76
5. Discusión.....	82
5.1. Actividad y expresión de MnSOD en las células glómicas del CB.....	83
5.2. Producción de ROS en ratas sometidas a CIH	86
5.3. Contribución del radical ONOO ⁻ sobre la potenciación quimiosensorial y el desarrollo de hipertensión inducida por CIH	88
5.4. Posible rol de la S-nitrosilación de proteínas en los cambios inducidos por CIH.....	91
5.5 Conclusiones.....	93
6. Bibliografía.....	95

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Páginas
Figura 1: Localización y estructura del cuerpo carotídeo	7
Tabla 1: Moduladores de la actividad quimiosensorial del CB	8
Figura 2: Propuesta.....	26
Figura 3: La CIH aumenta los niveles de MnSOD en glándulas adrenales de rata.....	39
Figura 4: Inmunorreactividad de MnSOD en glándulas adrenales de ratas sometidas a CIH..	40
Figura 5: La CIH no produce cambios en los niveles de MnSOD y CuZnSOD en médulas adrenales de ratas.....	42
Figura 6: La CIH incrementa la inmunorreactividad de MnSOD en cortes de CBs extraídos de ratas sometidas a CIH	44
Figura 7: Cuantificación de los niveles de MnSOD en homogenizados de CB.....	45
Figura 8: La CIH produce aumento de los niveles de MnSOD pero no modifica los niveles de CuZnSOD en CBs de ratas.....	47
Figura 9: CuZnSOD-ir en CBs de ratas control y sometidas a CIH.....	48
Figura 10: La CIH no genera cambios de MnSOD en el ganglio cervical superior de rata....	50
Figura 11: La CIH no cambia los niveles de MnSOD en el ganglio cervical superior.....	51
Figura 12: La CIH produce disminución de los niveles de NO generados por los CBs en el medio de incubación.....	54
Figura 13: La exposición a CIH incrementa los niveles de 3-NT en las células cromafines de la médula adrenal	56
Figura 14: La exposición a CIH incrementa los niveles de 3-nitrotirosinas en CBs de rata...	57
Figura 15: La CIH produce disminución de la actividad de la MnSOD en homogenizados de médula adrenal.....	60

	Páginas
Figura 16: La exposición a CIH aumenta la actividad de la MnSOD en homogenizados de CBs de rata	61
Figura 17: La CIH induce nitración de la MnSOD en médulas adrenales	64
Figura 18: La CIH produce nitración de la MnSOD en CBs de ratas.....	65
Figura 19: Registro de la actividad quimiosensorial del cuerpo carotídeo	68
Figura 20: La exposición a CIH produce potenciación quimiosensorial del CB.....	69
Figura 21: Curso temporal de la potenciación quimiosensorial medida en ratas sometidas a CIH.....	70
Figura 22: Las ROS mitocondriales son fundamentales para producir la potenciación quimiosensorial inducida por CIH	73
Figura 23: El radical ONOO ⁻ es esencial para generar la potenciación quimiosensorial del CB inducida por CIH	74
Figura 24: El tratamiento con Ebselen reduce los niveles de 3-NT en el CB.....	75
Figura 25: La CIH produce un aumento de la presión arterial que es revertido al suministrar Ebselen.....	78
Figura 26: El tratamiento con Ebselen revierte la hipertensión inducida por CIH.....	79
Figura 27: Las respuestas presoras inducidas por hipoxia aguda están aumentadas en animales sometidos a CIH, y dicho aumento es revertido al ser tratadas con Ebselen.....	80
Figura 28: El incremento en la respuesta presora inducido por CIH es revertido cuando las ratas son suministradas con Ebselen.....	81
Figura 29: Mecanismo propuesto para el desarrollo de hipertensión y la generación de la potenciación quimiosensorial del CB en ratas sometidas a CIH.....	94

ABREVIATURAS

*CIH	: Hipoxia intermitente crónica
*OSA	: Apnea obstructiva del sueño
*AHI	: Índice de apneas/hipopneas
*CB	: Cuerpo carotídeo
PO ₂	: Presión parcial de oxígeno
*LTF	: Facilitación sensorial de largo plazo
*ROS	: Especies reactivas de oxígeno
*ET-1	: Endotelina-1
*NO	: Óxido nítrico
O ₂ ⁻	: Radical superóxido
ONOO ⁻	: Radical peroxinitrito
*NOS	: Óxido nítrico sintasa
*nNOS	: Óxido nítrico sintasa neuronal
*iNOS	: Óxido nítrico sintasa inducible
*eNOS	: Óxido nítrico sintasa endotelial
H ₂ O ₂	: Peróxido de hidrógeno
*SOD	: Superóxido dismutasa
*MnSOD	: Manganeso superóxido dismutasa
*3-NT	: 3-nitrotirosina
*ir	: Inmunorreactividad
*CuZnSOD	: Cobre zinc superóxido dismutasa

*ECSOD	: Superóxido dismutasa extracelular
*HIF	: Factor de transcripción inducible por hipoxia
*MTP	: Poro de transición mitocondrial
* f_{χ}	: Frecuencia de descarga quimiosensorial
*IL-1 β	: Interleuquina 1 beta
*TNF- α	: Factor de necrosis tumoral alfa
N ₂ O ₂	: Dióxido de Nitrógeno

* Las abreviaturas incluidas en esta Tesis están en inglés debido a que de las figuras utilizadas están en el formato requerido para ser publicadas en revistas escritas en este idioma.

RESUMEN

La hipoxia se manifiesta en diferentes condiciones fisiológicas y patológicas en los seres vivos. Entre ellas, uno de los patrones de hipoxia más común es la hipoxia intermitente crónica que consiste en la ocurrencia de eventos de hipoxia de corta duración seguidos por episodios de normoxia, tal como ocurre en el síndrome de apnea obstructiva del sueño. Numerosos reportes demuestran que la hipoxia intermitente contribuye al desarrollo de alteraciones cardiovasculares e hipertensión que sufren los pacientes con apnea obstructiva del sueño. De hecho, se ha demostrado que, pacientes con apnea obstructiva del sueño o animales sometidos a hipoxia intermitente crónica, presentan potenciación de los reflejos ventilatorios, simpáticos y cardiovasculares en respuesta a la hipoxia aguda. Este aumento de respuestas ha sido atribuido a la potenciación de la reactividad de los quimiorreceptores del cuerpo carotídeo.

La potenciación quimiosensorial carotídea consiste en un aumento de la frecuencia de descarga de potenciales de acción del nervio carotideo en respuesta a un estímulo hipóxico agudo, pero los mecanismos celulares asociados a este fenómeno no se conocen completamente.

Pese a esto, se sabe que la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y en particular el radical superóxido (O_2^-) contribuyen a la potenciación quimiosensorial, ya que la administración de antioxidantes y/o agentes miméticos de las superóxido dismutasas (SODs) previenen la potenciación quimiosensorial. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio muestran que marcadores relacionados con el estrés oxidativo o las respuestas inflamatorias podrían estar implicados en la generación de la potenciación quimiosensorial, sin embargo, de ellas, sólo la formación de residuos de 3-nitrotirosinas (3-NT) presenta un correlato temporal con la aparición de la potenciación quimiosensorial. El O_2^- y el óxido nítrico pueden reaccionar formando radical peroxinitrito, que modifica residuos de tirosina

generando 3-NT. Por lo tanto, decidimos estudiar un posible mecanismo que explicara cómo, la formación de 3-NT, puede contribuir a la potenciación quimiosensorial del cuerpo carotídeo. Una de las proteínas susceptibles a sufrir nitración es la manganeso SOD (MnSOD). Esta enzima mitocondrial, normalmente regula los niveles tóxicos de O_2^- , pero presenta disminución de su actividad catalítica cuando es modificada por nitración en su sitio activo. Dado que los niveles de O_2^- dependen de la actividad catalítica de la MnSOD, cabe esperar que una disminución en su actividad por nitración aumente los niveles de ROS en las células quimiorreceptoras de cuerpo carotídeo, contribuyendo a la potenciación quimiosensorial.

Estudiamos el efecto de la hipoxia intermitente sobre la actividad quimiosensorial, los niveles de MnSOD y 3-NT en el cuerpo carotídeo de rata. Analizamos si la hipoxia intermitente genera cambios en la actividad de la MnSOD y si estos cambios se relacionan con la nitración de esta enzima.

Los resultados descritos en esta Tesis doctoral demuestran que la exposición a hipoxia intermitente crónica por 5 días produce aumento de la actividad del nervio carotídeo en respuesta a un estímulo de hipoxia aguda y que este aumento se mantiene luego de 7 días de hipoxia intermitente. Que cuerpos carotídeos de ratas sometidas a 3 días de hipoxia intermitente presentan aumento en los niveles de 3-NT, los que se mantienen altos luego de 5 y 7 días de exposición a hipoxia intermitente. Dado que el CB tiene un pequeño tamaño (500 μm de diámetro), usamos a las células cromafines de la médula adrenal como modelo de las células glómicas del CB. Encontramos que la exposición a 7 días de hipoxia intermitente también aumenta los niveles de 3-NT en las médulas adrenales.

Además, encontramos que en ratas sometidas a hipoxia intermitente la actividad de la MnSOD se encuentra disminuida en las médulas adrenales pero aumentada homogenizados

de cuerpo carotídeo, y que dichos cambios son prevenidos al administrar ácido ascórbico como antioxidante.

Por otra parte encontramos que, en ratas expuestas a hipoxia intermitente, no cambian los niveles de MnSOD en las médulas adrenales, pero sí están aumentados en homogenizados de cuerpo carotídeo. Sugiriendo que el aumento de actividad de la MnSOD en los cuerpos carotídeos se debe a un aumento de sus niveles.

Al medir los niveles de MnSOD nitrada a través de ensayos de co-inmunoprecipitación, encontramos que tanto en las médulas adrenales, como en los cuerpos carotídeos, los niveles de MnSOD nitrada en ratas sometidas a hipoxia intermitente es mayor que en las ratas controles, y que este aumento es prevenido con el tratamiento con antioxidantes.

Pese a que el aumento de actividad observado en los cuerpos carotídeos de ratas sometidas a CIH, descarta la contribución de la nitración de la MnSOD en la potenciación quimiosensorial, decidimos estudiar la contribución del radical peroxinitrito (inductor de la nitración) y de los ROS mitocondriales sobre la actividad quimiosensorial usando distintos antioxidantes. MitoTEMPO (específico contra ROS mitocondriales) y Ebselen (específico contra peroxinitrito), previenen el desarrollo de la potenciación quimiosensorial del CB. Además la administración de Ebselen revierte el aumento de la presión arterial inducido por hipoxia intermitente.

Estos resultados permiten concluir que la nitración de la MnSOD no está involucrada en el aumento de actividad quimiosensorial evocada por CIH. La producción de peroxinitrito y/o de ROS mitocondriales son fundamentales para desarrollar la potenciación quimiosensorial del cuerpo carotídeo observada en ratas sometidas a hipoxia intermitente. Y el tratamiento con Ebselen revierte la hipertensión inducida por CIH.

ABSTRACT

Hypoxia is manifested in several physiological and pathological conditions in living beings. Among them, one of the most common is the chronic intermittent hypoxia pattern, characterized by brief hypoxic episodes followed by normoxic episodes, such as occur in the obstructive sleep apnea (OSA) syndrome. Many studies shown that chronic intermittent hypoxia contributes to the development of cardiovascular diseases and hypertension observed in patients suffering OSA. Indeed, animals exposed to chronic intermittent hypoxia and OSA patients, have potentiated ventilatory, sympathetic and cardiovascular responses to acute hypoxia. These potentiated responses have been attributed to the increased reactivity of carotid body (CB) chemoreceptors.

The CB chemosensory potentiation consists on the increase in the discharge of impulses in carotid sinus nerve evoked by a hypoxic stimulus. Nevertheless, the mechanism underlying this phenomenon is not fully understood.

The use of antioxidant and superoxide dismutase mimetic molecules prevents CB chemosensory potentiation. This allows determine that, production of reactive oxygen species (ROS), and particularly superoxide radical (O_2^-), contribute to the CB chemosensory potentiation. Our results have shown that oxidative stress markers, or inflammatory response, may be involved in the generation of chemosensory potentiation. However, only generation of 3-NT residues (3-NT), correlates with the onset of chemosensory potentiation.

The O_2^- radical can reacts with nitric oxide producing peroxynitrite ($ONOO^-$), and can modify tyrosine residues to produce 3-NT. Therefore, we decide to study the contribution of 3-NT generation on the CB chemosensory potentiation. Mitochondrial manganese superoxide dismutase (MnSOD) regulate O_2^- levels, but reduces its activity when is nitrated.

Since O_2^- levels are regulated by catalytic activity of MnSOD, a decrease in MnSOD activity by nitration could increase the ROS levels in chemoreceptor cells of CB, contributing to chemosensory potentiation.

We studied the effect of CIH on chemosensory potentiation, the MnSOD and 3-NT levels in the rat CB. Also, we analyze if CIH produces changes in MnSOD nitration and activity.

The results exposed in this PhD Thesis shown that exposure to 5 days of CIH produces increase of CB chemosensory activity, and keeps elevated after 7 days of CIH; and the 3-NT levels are increased in CBs of rats exposed to 3, 5 and 7 days of CIH. Also, given the small size of CB (diameter of 500 μm), we used chromaffin adrenal cells, as a model of CB glomus cells. We found that exposure of 7 days of CIH increase the 3-NT levels in chromaffin adrenal cells.

The exposure to CIH decreases the activity of MnSOD in homogenates of adrenal medullas but is increased in homogenates of CBs. These changes in MnSOD activity are reversed in rats that were exposed to CIH but supplemented with ascorbic acid as an antioxidant.

Besides, we found increased levels of MnSOD in CBs extracted from rats submitted to CIH, but the MnSOD levels in adrenal medullas were unchanged. This result suggests that the increase in MnSOD activity in CB is due to the increase in the protein levels.

Using co-immunoprecipitation we found that nitrated MnSOD levels is increased in adrenal medulla and CBs of rat, and these increases were prevented with the administration of ascorbic acid during the CIH protocol.

Despite that the increase in MnSOD activity in CBs of rats exposed to CIH discard the contribution of nitrated MnSOD on chemosensory potentiation, we decide to study the contribution of $ONOO^-$ (a nitration inducer) and mitochondrial ROS on chemosensory potentiation using different antioxidants. Treatment with MitoTEMPO (against

mitochondrial ROS) and Ebselen (against ONOO⁻) totally prevent the CB chemosensory potentiation. Also, the administration of Ebselen reverses the CIH-induced increase of arterial blood pressure.

These results conclude that MnSOD nitration is not involved in chemosensory potentiation. The mitochondrial ROS and ONOO⁻ production are essential for the increased CB responses induced by CIH, and the administration of Ebselen revert the hypertension induced by CIH.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Apnea obstructiva del sueño.

Los seres vivos pueden estar expuestos a diversos patrones de hipoxia, como la hipoxia aguda que sufre un buzo que practica la técnica de apnea, o la hipoxia sostenida, a la que están sometidas las personas que viven a grandes alturas. Sin embargo, la forma de hipoxia que se presenta con mayor frecuencia en humanos es la hipoxia intermitente crónica (CIH), que se caracteriza por períodos hipóxicos de corta duración seguidos por episodios de normoxia, tal como ocurre en la apnea obstructiva del sueño (OSA). El síndrome de OSA se define como la obstrucción total o parcial de las vías respiratorias superiores, producido por el colapso de la faringe durante el sueño, generando episodios de apnea o hipopneas de 10 o más segundos de duración. OSA tiene una alta prevalencia; de hecho, afecta al 9% de los hombres adultos y al 4% de las mujeres (Young y cols. 1993). Un reporte de la *American Heart Association* en colaboración con el *National Center on Sleep Disorders Research* afirma que “el 85% de los pacientes que sufren niveles de OSA tratable y clínicamente relevante nunca son diagnosticados, y las poblaciones de pacientes con OSA reportados sólo representa la punta

del iceberg de la prevalencia de OSA". Por lo tanto, se estima que la población adulta que tiene un índice de apneas/hipopneas (AHI) de 5 episodios por hora, es cercano al 20% (Somers y cols. 2008). Esta patología produce somnolencia diurna, fatiga, caída del estado de ánimo, déficit atencional, déficit de la memoria verbal, visual y espacial además de disfunción ejecutiva (Beebe & Gozal, 2002; Naëgelé y cols. 1995). También existen estudios epidemiológicos que muestran que los desórdenes respiratorios asociados al sueño se relacionan con un aumento de la morbilidad y mortalidad por enfermedades cardiovasculares (Punjabi y cols. 2009). De hecho, OSA es considerado un factor de riesgo independiente para sufrir hipertensión, aproximadamente el 50% de los pacientes con OSA sufren ésta enfermedad, y se ha visto que existe una correlación positiva entre el AHI y el aumento de la presión arterial (Punjabi y cols. 2009; Eckert & Malhotra, 2008; Marin y cols. 2005; Pepard y cols. 2000; Shahar y cols. 2001; Young y cols. 1993). Además, OSA ha sido relacionada con otras enfermedades, tales como infarto al miocardio, hipertensión pulmonar, enfermedad arterial coronaria y fibrilación auricular (Dempsey y cols. 2010; McNicholas & Bonsignore, 2007; Parati y cols. 2007; Somers y cols. 2008; Narkiewicz y cols. 1998b y 1999).

1.2 La hipoxia intermitente crónica es el principal responsable de las consecuencias cardiovasculares de la OSA.

Los episodios de detención del flujo de aire que presenta el síndrome de OSA producen hipoxia intermitente e hipercapnia, presión intratorácica negativa, fragmentación del sueño y micro despertares. La hipoxia intermitente y la hipercapnia producida durante la oclusión de las vías aéreas superiores estimula a los quimiorreceptores del cuerpo carotídeo (CB)

produciendo una respuesta refleja que consiste en aumento de la actividad ventilatoria, simpática y una respuesta hipertensiva. De todos estos factores, la exposición a CIH es considerada el factor más importante en el desarrollo de hipertensión inducida por OSA (Dempsey y cols. 2010; Gozal & Kheirandish-Gozal 2008; Iturriaga y cols. 2005; Lavie 2003; Lévy y cols. 2008; Somers y cols. 2008). Aunque la relación entre OSA y la hipertensión es conocida, los mecanismos que explican el desarrollo de la hipertensión no están completamente resueltos. La explicación más aceptada propone que la CIH produce estrés oxidativo, inflamación y aumento de la actividad del sistema nervioso simpático, lo que produce disfunción endotelial e hipertensión (Dempsey y cols. 2010; Garvey y cols. 2009; Lavie, 2003; Gozal & Kheirandish-Gozal, 2008; Iturriaga y cols. 2009; Somers y cols. 2008). Se sabe que los pacientes recién diagnosticados con OSA presentan un aumento del tono simpático, de la reactividad vascular y de los reflejos ventilatorios evocados por hipoxia aguda (Loredo y cols. 2001; Narkiewicz y cols. 1998a, 1998b y 1999). Pero, las conclusiones obtenidas de los estudios realizados en pacientes que sufren OSA son aún insuficientes y controversiales, pues, por motivos éticos, los procedimientos invasivos están descartados. Además, los pacientes con OSA presentan co-morbilidades (alteraciones metabólicas, obesidad, enfermedades cardiovasculares, etc.) que pueden estar asociadas o actuar como factores que incrementan el riesgo cardiovascular. Es por esta razón, que los modelos animales de OSA, en los cuales roedores son sometidos a CIH y emulan las consecuencias patológicas de esta enfermedad (incluyendo la hipertensión), aparecen como la mejor solución para estudiar los mecanismos involucrados en esta patología (Del Rio y cols. 2010 y 2012; Dumitrascu y cols. 2013; Fletcher y cols. 1992a; Fletcher 2001; Iturriaga y cols. 2009; Peng y cols. 2003, 2006 y 2009; Peng & Prabhakar, 2003 y 2004; Prabhakar y cols. 2005).

Estos modelos animales han permitido estudiar los efectos fisiológicos y celulares producidos por la hipoxia, la que evoca respuestas en la mayoría de las células de los mamíferos. Por ejemplo, las células musculares lisas de las arterias pulmonares, se contraen frente a una hipoxia localizada; o las células cromafines de la médula adrenal de neonatos, liberan catecolaminas en respuesta a la hipoxia (Ward, 2008). Sin embargo, el detector de oxígeno más importante es el CB, pues es el único órgano capaz de generar respuestas sistémicas a la hipoxia, asegurando el suministro adecuado de oxígeno para todas las células del organismo (González y cols. 1994; Teppema & Dahan, 2010).

Los pacientes que sufren OSA presentan respuestas cardio-respiratorias aumentadas frente a la hipoxia aguda, lo que ha sido atribuido a una potenciación de los quimiorreflejos periféricos carotídeos frente a la hipoxia (Cistulli & Sullivan, 1994; Narkiewicz y cols. 1998a, 1998b, 1999), sugiriendo que los quimiorreceptores del CB juegan un papel crucial en las alteraciones patológicas inducidas por CIH. De hecho, Fletcher y cols. (1992a), encontraron que la denervación de los CBs previene la hipertensión en ratas sometidas a CIH, sugiriendo que el CB contribuye a las patologías cardiovasculares inducidas por CIH. Por lo que, en los últimos años, la idea de que el CB está involucrado en la progresión de la hipertensión inducida por CIH ha recibido especial atención (Dempsey y cols. 2010; Dumitrascu y cols. 2013; Garvey y cols. 2008; Somers y cols. 2008).

1.3 El cuerpo carotídeo es el principal sensor de oxígeno.

El CB está ubicado en la bifurcación carotídea (Fig. 1A), detecta los niveles de presión parcial de oxígeno (PO_2) en la sangre arterial, y tiene, en la rata, un diámetro cercano a los 400 μm (Pardal y cols. 2002), y un peso aproximado de 25 μg (Yuan y cols. 2013). En respuesta a un estímulo hipóxico, la estimulación del CB genera un aumento de potenciales de acción en el nervio carotídeo, produciendo hiperventilación, y aumento reflejo de la presión arterial (Paton y cols. 2013; Gonzalez y cols. 1994). Además de responder a la hipoxia, responde a hipercapnia, acidosis, cambios de la temperatura y de flujo, por lo que es clasificado como un receptor sensorial polimodal (Eyzaguirre & Zapata, 1984). Pese a su pequeño tamaño, éste órgano posee la mayor irrigación sanguínea por gramo de tejido (1,4-2,0 litros/100g de tejido/min), 6 veces mayor que el flujo cerebral medio (González y cols. 2003), permitiendo que incluso pequeños cambios en la PO_2 arterial sean rápidamente detectados por el CB, desencadenando las respuestas sistémicas necesarias para mantener la homeostasis del O_2 en el organismo.

La unidad funcional en el CB es el glomoide (Fig. 1B), formado por distintos tipos de células (Fig. 1C y D). Entre estas células, se destacan las relacionadas con la quimiorrecepción, llamadas células de tipo I o glómicas, que se agrupan en torno a vasos sanguíneos formando nidos celulares y cuya función es detectar los niveles de PO_2 arterial. El glomoide está constituido además, por las células de tipo II o sustentaculares, de origen glial, que se ubican rodeando a las células glómicas (González y cols. 2003). Si bien inicialmente se postuló que las células sustentaculares sólo tenían funciones de soporte, en el último tiempo han tomado mayor importancia, ya que participan en la proliferación celular inducida por

hipoxia sostenida, dando origen a nuevas células glómicas (Pardal y cols. 2007). Existen además células endoteliales presentes en los capilares del CB, y terminales nerviosos correspondientes a las neuronas quimiosensoriales que establecen sinapsis con las células glómicas (Fig. 1C y D). Los terminales nerviosos presentes en el glomoide provienen de neuronas quimiosensoriales aferentes primarias, cuyos somas se encuentran en el ganglio petroso. Estos axones, convergen en el nervio glossofaríngeo y proyectan al núcleo del tracto solitario generando las respuestas reflejas a la hipoxia que mantendrán el balance de los niveles de oxígeno (Iturriaga & Alcayaga 2004; González y cols. 2003; Teppema & Dahan, 2010). En respuesta a una disminución de la PO_2 las células glómicas se despolarizan, produciendo la entrada de calcio (Ureña y cols. 1989) y la liberación de uno o más neurotransmisores (Iturriaga & Alcayaga, 2004). Los transmisores se unen a receptores en los terminales axonales, generando un aumento de la frecuencia de potenciales de acción en el nervio carotídeo.

Se ha propuesto que ATP y acetilcolina serían los transmisores excitatorios (Alcayaga y cols. 2007). Pero además, existen moduladores de la actividad quimiosensorial del CB, tales como: endotelina 1 (ET-1) (Pawar y cols. 2009; Rey e Iturriaga, 2004b; Campanucci y cols. 2012), óxido nítrico (NO) (Iturriaga & Alcayaga, 2004; Li y cols. 2010; He y cols. 2007), serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Peng y cols. 2009), angiotensina II (Ang II) (Markus y cols. 2010; Peng y cols. 2011) o citoquinas (Del Rio y cols. 2011; Del Rio y cols. 2012) (ver Tabla 1).

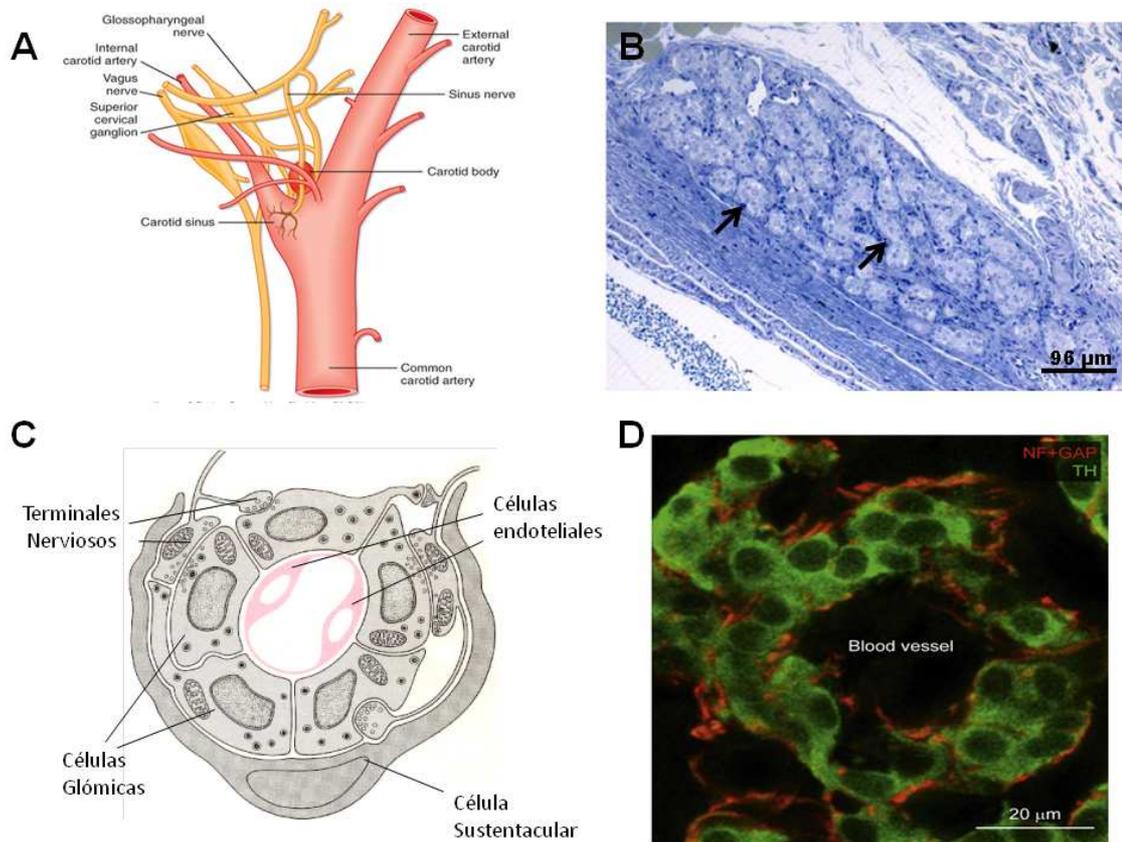


Figura 1. Localización y estructura del cuerpo carotídeo. El CB está ubicado en la bifurcación carotídea (A, Berne y Levy, 2008). Está formado por grupos de células quimiorreceptoras o glómicas (Flechas en B, modificado de De Caro y cols. 2013) que forman la unidad funcional del CB o glomóide (C, modificado de Eyzaguirre y Zapata, 1984) en donde podemos reconocer a las células glómicas por la inmunoreactividad positiva para tirosina hidroxilasa (TH) y los terminales neuronales sensoriales detectando neurofilamento/GAP-43 (NF+GAP) (D, Nurse & Piskuric, 2013).

MODULADOR	REFERENCIA
ROS	Peng y cols. 2003 ; Del Rio y cols. 2010; Gonzalez y cols. 2004.
Endotelina– 1	Rey y cols. 2006 y 2007.
Endotelina– 1 (Dependiente de ROS)	Pawar y cols. 2009 ; Peng y cols. 2013
Serotonina (5-HT)	Peng y cols. 2009
Reducción de NO (Inmunorreactividad de nNOS y eNOS reducida)	Markus y cols. 2010 ; Del Rio y cols. 2011 ; Moya y cols. 2012
Angiotensina II (Dependiente de la producción de O ₂ -)	Markus y cols. 2010 ; Peng y cols. 2011b
Citoquinas Pro-Inflamatorias (Dependiente de ROS)	Del Rio y cols. 2011 y 2012

Tabla 1. Moduladores de la actividad quimiosensorial del CB.

1.4 Potenciación de la actividad quimiosensorial del cuerpo carotídeo.

La hipoxia intermitente crónica potencia las respuestas quimiosensoriales a hipoxia aguda, lo que contribuye a la hipertensión inducida por CIH (Prabhakar y cols. 2005; Garvey y cols. 2009; Iturriaga y cols. 2009; Somers y cols. 2008). Y Fletcher y cols. (1992a), denervando los cuerpos carotídeos por sección bilateral de los nervios carotídeos, evitaron el desarrollo de hipertensión en los animales sometidos a CIH. Por lo que se ha propuesto que, la potenciación quimiosensorial carotídea juega un papel fundamental en el desarrollo de la hipertensión producida por CIH.

Reportes realizados en modelos animales demuestran que la CIH aumenta la reactividad del CB. Trabajos publicados por el grupo de Prabhakar muestran que en ratas, la CIH aumenta la descarga quimiosensorial basal y potencia las respuestas ventilatorias y quimiosensoriales a la hipoxia aguda (Peng y cols. 2003 y 2004; Peng y Prabhakar, 2003). El mismo grupo ha descrito que ratas sometidas a CIH por 10 días presentan facilitación quimiosensorial carotídea de largo plazo (LTF, o *long term facilitation*), que consiste en un aumento de la frecuencia de descarga basal del nervio carotídeo, luego de realizar 10 episodios de hipoxia (12% O₂) por 15 segundos, seguidos por 5 minutos de hiperoxia (95% O₂) (Peng y cols. 2003; Pawar y cols. 2008). Las especies reactivas de oxígeno (ROS) participan en la generación del LTF, ya que ratas administradas con un antioxidante mimético de la superóxido dismutasa, durante la exposición a CIH, no registraron el aumento de actividad basal del CB (Peng y cols. 2003).

Por otra parte, trabajos realizados en nuestro laboratorio, mostraron que gatos sometidos a hipoxia intermitente (ciclos de 10% O₂ por 30 segundos seguidos de 270 segundos de normoxia, 8 horas diarias por 4 días) presentan potenciación de las respuestas

quimiosensoriales (Rey y cols. 2004a) y que, ratas sometidas a CIH (ciclos de 5% O₂ por 1 minuto, 12 veces por hora, 8 horas diarias) desarrollan potenciación de las respuestas quimiosensoriales y ventilatorias a la hipoxia aguda, alteraciones simpáticas e hipertensión (Iturriaga y cols. 2009, Del Rio y cols. 2010).

Dado que la potenciación quimiosensorial contribuye al desarrollo de las respuestas fisiológicas y patológicas inducidas por CIH, como por ejemplo, la activación del sistema nervioso simpático, y el desarrollo de hipertensión (Iturriaga y cols. 2009, Semenza & Prabhakar, 2007), es importante estudiar los mecanismos que generan la potenciación de las respuestas quimiosensoriales a la hipoxia.

Se ha propuesto que las ROS contribuyen a las alteraciones cognitivas y cardiovasculares observadas en pacientes con OSA (Baguet y cols. 2012; Gozal & Kheirandish-Gozal, 2008; Susuki y cols. 2006) y en modelos animales (Chen y cols. 2005; Del Rio y cols. 2010-2012; Peng y cols. 2003-2011, Troncoso-Brindeiro y cols. 2007). Estudios realizados en pacientes con OSA y en animales expuestos a CIH muestran que los episodios de hipoxia-reoxigenación producen estrés oxidativo sistémico debido a la acumulación de las ROS. Por esto tanto las ROS como algunos conocidos moduladores de la actividad quimiosensorial carotídea (ET-1, NO y citoquinas) podrían actuar como mediadores de la potenciación quimiosensorial inducida por CIH (Tabla 1). En efecto, el tratamiento con antioxidantes durante el protocolo de CIH previene los cambios inducidos por CIH, tales como, el aumento de los niveles de ET-1 (Pawar y cols. 2009), el aumento de citoquinas pro-inflamatorias en el CB (Del Rio y cols. 2011 y 2012; Troncoso-Brindeiro y cols. 2007), la potenciación quimiosensorial, el aumento de actividad simpática y la hipertensión (Del Rio y cols. 2010; Peng y cols. 2003). Sin embargo, existe controversia respecto al mecanismo, por el

cual las ROS producen potenciación quimiosensorial. González y cols. (2004) midieron el cociente de glutatión reducido/oxidado en las células glómicas de rata y encontraron que cuando éste se modificaba no se producían cambios en la liberación de catecolaminas en respuesta a la hipoxia. Por lo tanto, proponen que la detección de los niveles de oxígeno por parte de las células glómicas es independiente del estado redox de la célula. Por otra parte, los estudios del grupo de Prabhakar muestran que los tratamientos miméticos de la superóxido dismutasa previenen la potenciación quimiosensorial (Peng y Prabhakar 2004, Peng y cols. 2003). Luego, es posible que los efectos del aumento de las ROS sobre la descarga quimiosensorial no ocurran directamente, sino que afecten a moléculas que participan en el proceso de detección del oxígeno, aunque no se conoce la naturaleza exacta del blanco molecular de las ROS. Peng y cols. (2003) han propuesto que el radical superóxido (O_2^-), podría modificar la actividad de alguna proteína con un dominio *heme*, o bien aumentar los niveles del Ca^{+} intracelular en las células glómicas, potenciando de esta manera la descarga quimiosensorial. Además, se ha propuesto que el O_2^- puede producir una disminución de las corrientes de K^{+} de salida contribuyendo a la hiperreactividad de las células glómicas (Peng y cols. 2003; Ding y cols. 2010), y se ha visto en células glómicas aisladas, la CIH produce aumento de la inhibición del canal de K^{+} tipo TASK inducida por hipoxia aguda, aumentando la excitabilidad de las células glómicas (Ortiz y cols. 2013), aunque no se ha demostrado si este cambio es producido por el aumento de ROS.

Por lo tanto, estos estudios sugieren que las ROS son fundamentales para producir los cambios en los niveles de los moduladores y el aumento de actividad de la descarga quimiosensorial; pero que, estos efectos no son realizados directamente por las ROS, sino que por las modificaciones que estos radicales generan.

1.5 Rol del óxido nítrico en el CB.

Varios estudios han propuesto que el NO sería un modulador inhibitorio de la respuesta quimiosensorial del CB a la hipoxia aguda (Iturriaga & Alcayaga, 2004; Li y cols. 2010; He y cols. 2007). L-Arginina produce disminución de la respuesta quimiosensorial a la hipoxia de manera dosis dependiente en la preparación de CB superfundido *in vitro* (Wang y cols. 1994). La aplicación de generadores de NO en preparaciones de CB perfundido *in vitro*, disminuye la respuesta quimiosensorial a la hipoxia aguda (Iturriaga y cols. 2000b), y además, produce efectos inhibitorios sobre la respuesta a nicotina y NaCN, clásicos estimuladores de la respuesta quimiosensorial (Valdés y cols. 2003). Asimismo, la aplicación de solución fisiológica *Tyrode* equilibrada con NO gaseoso en CB de gato perfundido *in vitro* produce disminución de las respuestas quimiosensoriales evocadas por hipoxia (Iturriaga y cols. 2000a).

Por otra parte, un trabajo de nuestro laboratorio mostró un efecto dual del NO. Cuando se aplican dosis bajas de dadores de NO a una preparación de CB perfundida durante un estímulo hipóxico se observa el habitual efecto inhibitorio sobre la descarga. Sin embargo, cuando se aplican altas dosis de dadores de NO en condiciones basales (normóxicas), se produce excitación quimiosensorial (Iturriaga y cols. 2000b). Estos resultados apoyan la idea de que el NO en dosis bajas, produce inhibición de las respuestas quimiosensoriales regulando el tono vascular, pero no descarta que el NO puede modular la excitabilidad de las células glómicas y de las neuronas quimiosensoriales del ganglio petroso (Rey & Iturriaga, 2004; Nurse, 2010; Moya y cols. 2012). El NO a altas dosis, o su metabolito, el peroxinitrito (ONOO⁻), podrían contribuir a la potenciación quimiosensorial del CB inhibiendo la cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa (Brown, 1999; Cassina & Radi,

1996), o produciendo modificaciones post-traduccionales en las proteínas (Yamakura & Kawasaki, 2010, Pacher y cols. 2007).

En el CB se encuentran presentes las tres isoformas de óxido nítrico sintasas (NOS). Por *Western blot* e inmunohistoquímica, se ha detectado la presencia de las isoformas neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS) (Gozal y cols. 1996; Di Giulio y cols. 2005; Ye y cols. 2002; Del Rio y cols. 2010), y se ha visto que la expresión de iNOS está aumentada en CBs de ratas sometidas a hipoxia crónica sostenida (Di Giulio y cols. 2005; Ye y cols. 2002). Resultados de nuestro laboratorio muestran que CBs de ratas que fueron sometidas a 21 días de CIH presentan una menor inmunorreactividad contra eNOS y una mayor inmunorreactividad contra iNOS (Del Rio y cols. 2010), en comparación a las ratas *sham* (sometidas a las mismas condiciones que las ratas CIH, pero expuestas a ciclos de aire: aire en vez de los episodios de hipoxia). Más aún, al estudiar el curso temporal de los cambios en los niveles de las NOS, encontramos que a los 7 días de CIH se produce una disminución acentuada de los niveles de eNOS y que los niveles de iNOS sólo aumentan luego de 21 días de CIH (Del Rio y cols. 2011). Tal como sugieren los experimentos de expresión de eNOS, los CB de las ratas que son sometidas a CIH por 7 días, presentan una disminución de los niveles de NO generado en el medio de incubación. Esta caída de la producción de NO se revierte a 14 y 21 días de CIH (Moya y cols. 2012).

1.6 Las ROS contribuyen a los cambios generados en el CB en respuesta a CIH.

El oxígeno molecular es un potente agente oxidante que es secuencialmente reducido a H₂O, generando radicales libres de oxígeno además de otros derivados no radicales, pero

altamente reactivos, durante este proceso. Las ROS que fundamentalmente se forman son O_2^- , peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) (Dröge, 2002). La reducción de O_2 con un electrón genera el radical O_2^- , que es una molécula inestable que en un medio acuoso puede dismutar a H_2O_2 . Esta reacción puede ocurrir de forma espontánea, aunque también puede ser inducida por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD); de hecho, bajo condiciones normales las concentraciones celulares de O_2^- se mantienen a niveles bajos ($\sim 10^{-10}$ M) por la acción de la SOD. El radical O_2^- también puede reaccionar con el NO para formar el radical $ONOO^\cdot$, otro radical inestable que puede iniciar la peroxidación de lípidos u otros efectos citotóxicos (Yamakura & Kawasaki, 2010; Hancock y cols. 2001; Thannickal & Fanburg, 2000; Haddad 2004). Estas moléculas pueden oxidar diversos blancos moleculares entre los que se incluyen lípidos, DNA y proteínas (Suzuki y cols. 2006).

Los ciclos de hipoxia-reoxigenación producidos en animales sometidos a CIH y en pacientes con OSA generan aumentos de ROS (Suzuki y cols. 2006). Se piensa que las ROS tienen un rol fundamental en la generación de las consecuencias patológicas inducidas por CIH (Lavie, 2003; Suzuki y cols. 2006; Iturriaga y cols. 2009). Se han propuesto dos orígenes para las ROS generadas durante la CIH: uno mitocondrial y el otro citoplasmático.

En el primero, aproximadamente el 1-3% de los electrones que pasan por la cadena respiratoria pueden escapar de la vía que finaliza con el oxígeno como aceptor final. Este escape ocurriría principalmente en el complejo I y en el complejo III de la cadena transportadora de electrones (MacFarlane y cols. 2008). Además, la formación de ROS por disminución de la actividad del complejo I mitocondrial ha sido involucrada con el LTF, que es el aumento de actividad quimiosensorial del CB luego de 10 episodios de hipoxia (Peng y cols. 2003).

La segunda propuesta para el origen de las ROS, está dada a partir de la producción enzimática de ROS, principalmente por la actividad de la enzima citoplasmática NADPH oxidasa. Esta enzima, formada por 5 sub-unidades, dos de ellas pueden unirse a la membrana (gp91^{PHOX} y p22^{PHOX}), y tres sub-unidades citosólicas (p67^{PHOX}, p47^{PHOX} y p40^{PHOX}), cataliza la producción de O₂⁻ a partir de O₂ y NADPH. Existe evidencia que muestra un aumento de la actividad y de la expresión de NADPH oxidasa en ratas que fueron sometidas a CIH por 10 días, y además, que ratones mutantes para NADPH oxidasa no desarrollan LTF. Estos datos indican que la actividad de NADPH oxidasa sería fundamental para generar el LTF inducido por CIH en estas ratas (Peng y cols. 2009).

Cualquiera sea su origen, existe consenso en que las ROS juegan un papel crucial en la generación de las consecuencias patológicas inducidas por hipoxia intermitente (Suzuki y cols. 2006; Lavie 2003). De hecho, diversos estudios muestran que la CIH genera estrés oxidativo por acumulación de ROS produciendo peroxidación de lípidos, daño en el ADN, oxidación de proteínas y apoptosis (Lavie 2003; Gozal & Kheirandish-Gozal 2008; Troncoso-Brindeiro y cols. 2007).

Además, la utilización de distintos antioxidantes previene las consecuencias inducidas por CIH. La administración de agentes miméticos de la superóxido dismutasa, como TEMPOL (Troncoso-Brindeiro y cols. 2007) o MnTMPyP (Peng y cols. 2003), previenen el aumento de los niveles de ROS en el plasma, la actividad potenciada del CB y el desarrollo de hipertensión. Además, la administración del antioxidante ácido ascórbico durante la exposición a CIH previene la potenciación quimiosensorial del CB, el aumento de actividad del sistema nervioso simpático, el aumento de citoquinas pro-inflamatorias y la hipertensión (Del Rio y cols. 2010, 2011 y 2012).

Dado que las ROS son especies altamente reactivas, y que los efectos de las ROS pueden deberse a distintas especies (Peng y cols. 2006, Del Rio y cols. 2010) es posible suponer que la CIH genere un aumento de varios tipos de especies radicalarias. Sin embargo hasta ahora, existe especial atención en la producción del radical O_2^- . Este radical es producido tanto por la mitocondria como por la enzima NADPH oxidasa, y existen publicaciones que muestran que se produce O_2^- en el CB de ratas sometidas a CIH (Marcus y cols. 2010, Peng y cols. 2003).

Existe controversia respecto al mecanismo, por el cual el radical O_2^- puede producir potenciación quimiosensorial. Como ya se dijo, las ROS podrían modificar la actividad de proteínas, los niveles de Ca^{+} intracelular, o las corrientes de K^{+} de salida de las células glómicas produciendo, de esta manera, la potenciación quimiosensorial. Sin embargo, existe la posibilidad de que las ROS generadas en CIH produzcan la activación de factores de transcripción. Peng y cols. (2006) encontraron que ratones mutantes heterocigotos para el factor de transcripción inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α) no presentaban potenciación de la respuesta quimiosensorial del CB ni de las respuestas ventilatorias a la hipoxia aguda luego de haber sido sometidos a hipoxia intermitente. Por otra parte, Nanduri y cols. (2009) encontraron que la hipoxia intermitente produce una disminución de los niveles de HIF-2 α en células PC12, en el CB y en glándula adrenal (células sensibles a O_2), y que en éstas últimas, la disminución de HIF-2 α tendría una correlación con el aumento del estrés oxidativo. Más aún, un reciente trabajo del mismo grupo (Yuan y cols. 2013) propone que existe interacción entre estos dos factores de transcripción (HIF-1 α y HIF-2 α) y que el aumento en los niveles de uno afecta los niveles del otro, interviniendo directamente en los niveles de sus respectivos genes blanco NADPH oxidasa y Manganese SOD (MnSOD), lo que tendría directa incidencia sobre

el balance oxidativo de la célula. Sin embargo, estos resultados aún no han sido confirmados por otros grupos y no establecen una causalidad de las ROS sobre los factores de transcripción, o viceversa.

Por otra parte, el factor de transcripción NF- κ B, sería activado por el aumento de ROS y produciría la activación de la respuesta inflamatoria (Williams y Scharf, 2007). De hecho, el tratamiento con secuestradores de ROS bloquea la cascada de señalización de NF- κ B en diferentes modelos celulares, sugiriendo que existe regulación de las ROS sobre las quinasas que regulan la activación de NF- κ B (Haddad, 2004). Una publicación realizada por nuestro laboratorio muestra que la CIH produce aumento de las citoquinas pro-inflamatorias interleuquina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en el CB de rata. Este aumento es prevenido cuando las ratas son tratadas con antioxidante (ácido ascórbico) durante la exposición a CIH, sugiriendo que el aumento de factores inflamatorios es secundario a la generación de ROS. Sin embargo, cuando se administró ibuprofeno a las ratas sometidas a CIH, se suprimió el aumento de TNF- α e IL-1 β , pero no se previno la potenciación quimiosensorial carotídea (Del Rio y cols. 2012).

Otro modulador de la actividad quimiosensorial es la ET-1 que está presente en el CB (Rey y cols. 2006; Peng y cols. 2013), y los niveles de ET-1 se encuentran aumentados en animales sometidos a CIH (Peng y cols. 2013). La aplicación de dosis crecientes de ET-1 en una preparación de CBs superfundidos produce incremento de la frecuencia de descarga quimiosensorial, la que estaría actuando a través del receptor de ET-1 tipo A (Rey y cols. 2004b y 2006). La aplicación de bloqueadores del receptor de ET-1 A en CBs perfundidos o superfundidos previene el aumento de actividad quimiosensorial carotídea inducido por CIH (Rey y cols. 2006; Peng y cols. 2013). Pese a esto, la utilización de antagonistas de los

receptores de ET-1 tipo A o B no tienen efectos sobre el LTF inducido por CIH, por lo que no explica por completo la potenciación del CB (Peng y cols. 2013).

De esta manera, el balance de las ROS, y principalmente del radical O_2^- , juegan un papel fundamental en la generación de las consecuencias patológicas de la CIH, afectando directamente la excitabilidad de las células glómicas o alterando la actividad de los factores de transcripción, pero ninguno de los candidatos propuestos (canales de K^+ , proteínas con dominio *heme*, factores de transcripción, etc.) a ser afectados por el radical O_2^- es determinante en la generación de la potenciación quimiosensorial. Si bien otros moduladores de la actividad quimiosensorial tales como NO, citoquinas pro-inflamatorias o ET-1, participan en el incremento de la actividad del CB, no permiten dilucidar completamente su contribución a la potenciación quimiosensorial, pues en muchos casos los cambios en sus niveles son secundarios al aumento de los niveles de ROS (Tabla 1). Por esto, es posible que los radicales libres generados a partir de las reacciones que sufre el radical O_2^- , o sus efectos, sean los responsables de la potenciación quimiosensorial.

1.7 La formación de 3-Nitrotirosinas en el CB tiene un posible rol fisiológico.

El NO y el O_2^- pueden unirse formando $ONOO^-$, una molécula que puede atacar residuos de tirosina en diferentes proteínas y modificarlas post-traduccionalmente formando 3-nitrotirosinas (3-NT). Usando técnicas inmunohistoquímicas encontramos que en CBs de ratas sometidas a CIH por 21 días, se produce un aumento de la marca contra 3-NT (3-NT-ir) en comparación a ratas control (Del Rio y cols. 2010).

Al estudiar el curso temporal de los aumentos de la marca de 3-NT y la potenciación quimiosensorial, encontramos que existía correlación positiva entre los dos parámetros. Los animales que fueron expuestos a sólo 7 días de CIH presentaban potenciación quimiosensorial en respuesta a la hipoxia aguda, de hecho, existe un aumento de la frecuencia de descarga durante normoxia (130 Torr), y en respuesta a distintos niveles de hipoxia (100, 70, 30 y 5 Torr). Además, esta potenciación quimiosensorial se mantiene en animales que han sido sometidos a CIH por 14 y 21 días. El análisis de la 3-NT-ir en animales sometidos a CIH por 7, 14 y 21 días, reveló que sólo 7 días de CIH son necesarios para inducir un aumento de los niveles de 3-NT en el CB. Si bien encontramos 3-NT-ir en algunas células glómicas en CBs de animales control, el aumento de 3-NT-ir luego de 7 días se mantiene después de 14 y 21 días de CIH.

Por lo tanto, cuando sometemos ratas a 7 días de CIH existe un aumento en la actividad del nervio carotídeo frente al estímulo hipóxico, y este cambio ocurre de manera simultánea al aumento en la formación de 3-NT (Del Rio y cols. 2011).

Por otra parte, encontramos que si se suplementa a las ratas con el antioxidante ácido ascórbico (1,25 g/L) durante la exposición a CIH, se reduce el estrés oxidativo plasmático (medido por el método de TBARS), y no ocurre potenciación quimiosensorial a la hipoxia aguda y tampoco aumento de 3-NT-ir inducido por CIH en el CB (Del Rio y cols. 2010).

Aunque estos resultados no permiten determinar si existe una relación causal entre la formación de 3-NT y el aumento de la frecuencia de descarga quimiosensorial del nervio carotídeo inducida por CIH, no descartan la posibilidad de que la formación de residuos de 3-NT modifique la actividad de proteínas o enzimas, contribuyendo, de esta manera, al fenómeno de potenciación quimiosensorial.

1.8 Superóxido dismutasa en el CB.

La SOD es una enzima que se encuentra prácticamente en todos los tipos de células y cataliza la dismutación del radical O_2^- , formando oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En las células eucariontes existen tres isoformas de SOD: CuZnSOD, MnSOD y ECSOD (SOD 1, 2 y 3 respectivamente para sus homólogos en humanos), las que han sido denominadas de acuerdo a los co-factores que participan en la catálisis del O_2^- . CuZnSOD es una isoforma soluble y fue la primera SOD caracterizada en células eucariontes. Ha sido encontrada en citoplasma, núcleo, microsomas, y en algunos casos en el espacio intermembrana de la mitocondria (Miao y St Clair, 2009; Culotta y cols. 2006). Por otra parte, la isoforma MnSOD se encuentra sólo en la matriz mitocondrial, a pesar que el polipéptido de MnSOD es generado a partir de un gen nuclear, contiene en su extremo N-terminal una secuencia-sígnal que destina esta proteína a la matriz de la mitocondria. Finalmente, la isoforma ECSOD usa como cofactores a Cu y Zn, pero es típicamente producida en células del músculo liso vascular y es secretada al medio extracelular donde se une a la matriz extracelular y a los componentes endoteliales (Culotta y cols. 2006).

La SOD es una proteína clave en la regulación del estrés oxidativo, pues controla los niveles celulares de O_2^- . Se ha propuesto que, tanto SOD como sus similares farmacológicos tienen potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Perry y cols. 2010). Como ya fue descrito, el uso de miméticos de la MnSOD (MnTMPyP y Tempol), previene las consecuencias de la CIH, tales como el aumento en los niveles de ROS plasmáticos, la generación de LTF, el aumento de expresión del factor HIF-1 α y el desarrollo de hipertensión (Peng y cols. 2003, 2006; Troncoso-Brindeiro y cols. 2007). Pese a que estos estudios muestran el efecto de los análogos de SOD sobre las consecuencias

de la CIH, existen pocos estudios que muestren los cambios que induce la CIH sobre la actividad o la expresión de la SOD en el CB, y no hay estudios respecto a cómo estos cambios podrían contribuir a la potenciación quimiosensorial inducida por CIH.

Los primeros estudios que mostraron expresión de CuZnSOD y de la MnSOD en el CB fueron realizados en un modelo de falla cardíaca crónica en conejos (Ding y cols. 2010 y 2009). En este modelo patológico, los conejos desarrollan un aumento de la actividad quimiosensorial y un aumento de la actividad de los nervios simpáticos renales, tal como ocurre en los animales sometidos a CIH. El grupo de Schultz (Ding y cols. 2010), encontró que los CBs de los conejos con falla cardíaca crónica presentan una disminución en los niveles de la MnSOD, niveles aumentados de O_2^- , y una disminución en las corrientes de salida de potasio. El aumento en los niveles de O_2^- y la disminución de las corrientes de potasio son revertidos al transfectar con un adenovirus el gen de MnSOD a los CBs. Estos resultados sugieren que la disminución de la actividad o de la expresión de la MnSOD puede afectar la excitabilidad celular, lo que se traduce en un aumento de la descarga basal quimiosensorial.

En los últimos años, el grupo de Nanduri Prabhakar ha estudiado la actividad y expresión de MnSOD en células cromafines de la médula adrenal y cultivos de células PC12. Estos autores, han utilizado a estas células como análogas de las células glómicas, debido a que comparten algunas características, tales como, su origen embrionario o la capacidad de producir y liberar catecolaminas en respuesta a la hipoxia (Semenza & Prabhakar, 2007; Kumar y cols. 2006), tal como lo hacen las células quimiorreceptoras del CB, por lo que responden a la falta de oxígeno activando mecanismos similares. De hecho, se ha descrito a la tirosina hidroxilasa como un marcador de células glómicas.

La razón para usar células cromafines de la médula adrenal y PC12 es que, debido al tamaño del CB, es muy difícil la obtención de un alto número de células que puedan ser utilizadas para determinaciones moleculares. Por lo tanto, se ha propuesto que las células cromafines de la médula adrenal y/o los cultivos de células PC12, se comportarían de la misma manera que las células quimiosensoriales del CB (Yuan y cols. 2013; Nanduri y cols. 2011; Nanduri y cols. 2009; Peng y cols. 2011). Nanduri y cols. (2009), encontraron que la CIH produce disminución de la actividad y expresión del RNA transcrito desde el gen de la MnSOD, resultado que no ha sido confirmado utilizando estudios de *Western blot* por la limitación que presenta el pequeño tamaño del CB. Resultados similares fueron encontrados en patrones similares de hipoxia en células PC12 o de la médula adrenal (Nanduri y cols. 2009; Peng y cols. 2011; Nanduri y cols. 2012).

Si bien estos autores han reportado que el HIF-2 α regula la expresión de la MnSOD, el mecanismo por el cual se generan los cambios en actividad o expresión de MnSOD en células sensibles a hipoxia no está completamente aclarado.

La actividad de las SODs puede ser regulada por modificaciones post-traduccionales, de las cuales la nitración por formación de residuos de 3-NT es una de las más importantes (Yamakura y Kawasaki, 2010). De hecho, la actividad de CuZnSOD humana disminuye en un 90% luego de ser incubada en un medio con ONOO⁻ (Álvarez y cols. 2004). Al estudiar la modificación de la actividad de MnSOD, se ha encontrado mediante ensayos de MnSOD recombinante (expresada en *Escherichia coli*) que la incubación con ONOO⁻ inhibe completamente su actividad, y que la causa de esta inhibición sería la nitración de tres residuos de tirosina en las posiciones 34, 45 y 193, siendo la más susceptible la tirosina en posición 34,

ya que se encuentra en el sitio activo de la enzima (MacMillan-Crow y cols. 1998; Yamakura y cols. 1998).

Como se mencionó antes, tanto la CuZnSOD como la MnSOD disminuyen su actividad cuando son incubadas con OONO^- *in vitro*. Sin embargo, se ha descrito que la nitración de las tirosinas sólo ocurre en la MnSOD, y que no ocurre en la CuZnSOD debido a que esta isoforma no tiene residuos de tirosina en su estructura primaria (Demicheli y cols. 2007). El mecanismo que explica la inhibición de la actividad de la CuZnSOD inducida por OONO^- involucra la auto-oxidación de la CuZnSOD por la formación de especies oxidantes unidas a cobre y la formación de un radical histidinil (a partir de histidina y HO^\cdot) (Álvarez y cols. 2004; Gunther y cols. 2002).

Por lo tanto, es posible que en el CB de ratas sometidas a CIH, la nitración de la MnSOD produzca disminución de su actividad y que genere un aumento de radical O_2^- . Luego, que este aumento contribuya a la potenciación quimiosensorial desencadenando un aumento de la actividad del sistema nervioso simpático y finalmente, el desarrollo de hipertensión. El hecho que se produzca un aumento de los niveles de O_2^- por la nitración de la MnSOD supone la generación de un círculo vicioso: inicialmente aumenta el O_2^- , lo que produce un incremento en los niveles de ONOO^- , que reacciona con diversos blancos moleculares entre ellos la MnSOD, que sufriría nitración y disminución de su actividad. Esto produciría mayor incremento de O_2^- en el CB. Este fenómeno sería similar al mecanismo que ocurre en aloinjertos de riñón humano extraídos de pacientes sometidos a una nefrectomía, luego de sufrir la pérdida del injerto por rechazo crónico (MacMillan-Crow y cols. 1996).

No existen estudios sobre el efecto de la CIH sobre la actividad de MnSOD en el CB. Sin embargo, sí se ha estudiado la actividad de MnSOD en células PC-12 y en homogenizados

de médula adrenal, y se ha encontrado que la hipoxia intermitente genera una disminución de la actividad de MnSOD en estos tipos celulares. (Nanduri y cols. 2009).

Por otra parte, como se dijo anteriormente, la CIH puede producir un incremento de los niveles de O_2^- en el CB, cuyo origen podría ser la NADPH oxidasa o la cadena respiratoria mitocondrial. Dado que el radical O_2^- es una molécula cargada que no atraviesa las membranas lipídicas libremente, es posible que su efecto se encuentre compartimentalizado, y que los reservorios de O_2^- en la matriz mitocondrial y en el citoplasma permanezcan separados. Sin embargo, existe evidencia de que, tanto el radical O_2^- producido por la NADPH oxidasa como el O_2^- producido en la misma matriz, puede generar despolarización de la membrana mitocondrial y activación de un poro de transición de la permeabilidad mitocondrial (MTP), que permite la salida de radicales libres desde la matriz mitocondrial al citoplasma (Daiber, 2010). De hecho, se ha visto que los cardiomiocitos responden con ráfagas de producción de O_2^- mitocondrial frente a estímulos de hipoxia-reoxigenación (Wang y cols. 2008). Estos mecanismos podrían permitir en las células glómicas el intercambio de radicales libres y de otras señales entre la matriz mitocondrial y el citoplasma de las células glómicas.

1.9 Propuesta.

Los resultados de los experimentos realizados en ratas sometidas a CIH apoyan la idea que las ROS juegan un rol fundamental en la generación de la potenciación quimiosensorial inducida por CIH, lo que contribuye a aumentar el tono simpático, disfunción endotelial y producir hipertensión (Peng y cols. 2003; Lavie, 2003; Iturriaga y cols. 2009; Del Rio y cols. 2010). Estudios realizados hasta ahora, demuestran que en estos procesos, tiene especial importancia

el radical O_2^- (Marcus y cols. 2010; Peng y cols. 2003), y que puede ser generado por enzimas como la NADPH oxidasa, o por la cadena transportadora de electrones de la mitocondria. El radical O_2^- podría favorecer la potenciación quimiosensorial carotídea, induciendo la activación de factores de transcripción, aumentando el daño oxidativo o aumentando la excitabilidad de las células quimiorreceptoras. Sin embargo, estos efectos podrían ser provocados de manera indirecta, como por ejemplo a través de la nitración de proteínas a partir de $ONOO^-$.

Además, nuestros resultados previos, muestran que la potenciación quimiosensorial ocurre en CBs de ratas sometidas a CIH por sólo 7 días y que existe un aumento paralelo de la acumulación de 3-NT-ir en el CB. Por otra parte, el tratamiento de las ratas sometidas a CIH con ácido ascórbico previene la potenciación quimiosensorial y el aumento de 3-NT-ir (Del Rio y cols. 2010).

Por lo tanto, la nitración de las tirosinas podría modificar diferentes proteínas dentro del CB, produciendo la potenciación quimiosensorial.

Ya que la MnSOD es clave para controlar los niveles celulares de O_2^- , que cuando es modificada post-traduccionalmente por formación de 3-NT disminuye su actividad; y que en células que responden a la hipoxia se ha observado una disminución de la actividad de MnSOD inducida por CIH, la MnSOD surge como un buen candidato para ser un blanco modificado por nitración (Fig. 2). Luego, es posible que en el CB de ratas sometidas a CIH se produzca una inhibición de la actividad de MnSOD por formación de 3-NT, favoreciendo el aumento de los niveles del radical O_2^- producido por CIH lo que contribuye a generar las consecuencias patológicas inducidas por CIH.

El propósito de esta Tesis Doctoral es estudiar la contribución de la formación de 3-NT sobre el proceso de potenciación quimiosensorial y si la CIH modifica la actividad o expresión de la MnSOD en el CB de ratas que fueron sometidas a CIH.

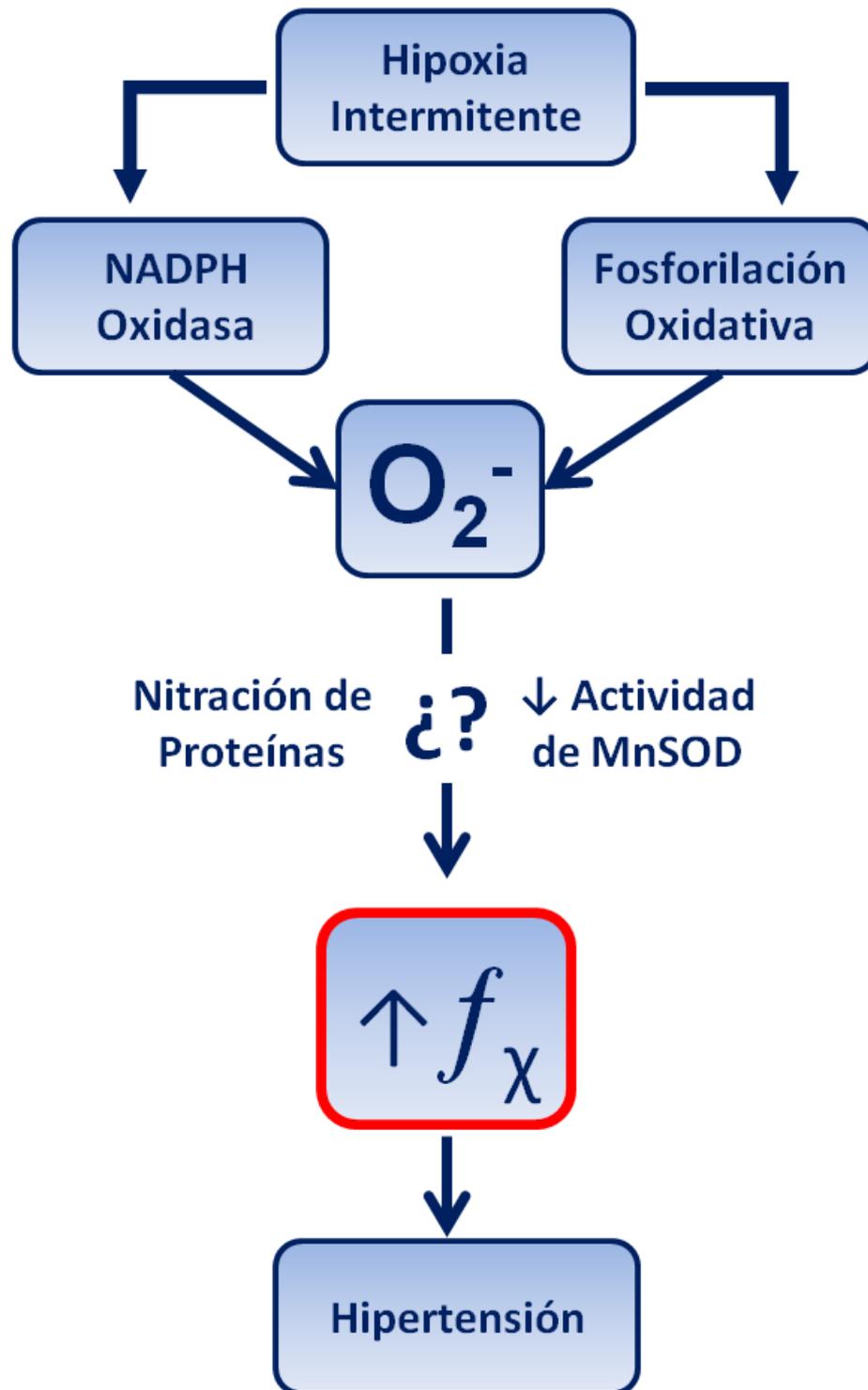


Figura 2. Propuesta. Esquema que muestra los posibles orígenes del radical O_2^- y sus efectos sobre la potenciación de la descarga quimiosensorial (f_χ) del CB y el desarrollo de hipertensión.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La evaluación y consideración de los datos expuestos anteriormente me llevaron a plantear la siguiente hipótesis:

2.1 Hipótesis

La nitración de proteínas contribuye a la potenciación quimiosensorial del cuerpo carotídeo de ratas sometidas a hipoxia intermitente crónica.

2.2 Objetivos

2.2.1 Evaluar si la CIH modifica los niveles de MnSOD.

Determinar por *Western blot* y/o inmunohistoquímica los niveles de MnSOD en cuerpos carotídeos, células cromafines de la médula adrenal, y en el ganglio cervical superior, extraídos de ratas sometidas a CIH.

2.2.2 Cuantificar el estado redox en ratas sometidas a CIH.

Determinar los cambios en la producción de NO y cuantificar los efectos de las especies reactivas de oxígeno midiendo los niveles de 3-NT en CBs de ratas sometidas a CIH.

2.2.3 Determinar si la CIH produce nitración de la MnSOD.

Evaluar si la exposición a CIH produce nitración de la MnSOD en homogenizados de médulas adrenales y de CBs de ratas expuestas a CIH. Y cuantificar la actividad de la MnSOD en CBs y médulas adrenales de ratas sometidas a CIH.

2.2.4 Estudiar la contribución del ONOO⁻ sobre la potenciación quimiosensorial.

Establecer el curso temporal de la potenciación quimiosensorial en ratas sometidas a CIH. Evaluar el efecto de los antioxidantes MitoTEMPO y Ebselen sobre la potenciación quimiosensorial del CB. Y evaluar los efectos del tratamiento con Ebselen sobre la hipertensión inducida por CIH.

3. MÉTODOS

3.1 Animales.

En esta Tesis Doctoral se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley obtenidas desde el vivero de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Los protocolos experimentales fueron aprobados por la Comisión de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile y por FONDECYT-CONYCIT 2010.

3.1.1 Modelo de hipoxia intermitente crónica en ratas.

Ratas Sprague-Dawley machos (200 g) se sometieron a CIH (fracción inspirada de $O_2 \sim 5\%$ por 20 segundos, seguidos de 280 segundos de normoxia, 12 veces por hora por 8 horas al día) por 7 días, excepto en los casos en que la exposición a CIH duró 3 o 5 días. Para esto las ratas se colocaron en cámaras individuales de acrílico (12 cm x 35 cm, 2,2 L de volumen) que cuentan con ventiladores ubicados en la parte frontal de la cámara. Estos ventiladores permiten el flujo de aire y evitan la acumulación de CO_2 y vapor de agua cuando las ratas están siendo sometidas al protocolo de hipoxia. Los ventiladores se

detienen cada 5 minutos para inyectar N₂ al 100% a través de válvulas solenoides conectadas a cilindros de N₂. El flujo de N₂ disminuye la fracción inspirada de O₂ en la cámara (O₂ ~ 5%). Un temporizador computarizado (Zelio Logic SR2, Telemecanique) controla los tiempos de encendido y apagado de las válvulas y los ventiladores.

El porcentaje de O₂ en las cámaras fue medido con un sensor de oxígeno (Ohmeda 5120, GE). La sala de experimentación se mantuvo termorregulada a 24-25°C y en condiciones de luz con ciclos de 12 horas desde las 7:00 a las 19:00 Hrs. durante toda la exposición de las ratas a la CIH. El grupo de animales controles o *sham* se expuso a las mismas condiciones de manejo y aseo que los animales expuestos a CIH, pero fueron sometidos a ciclos de aire : aire.

3.1.2 Utilización de antioxidantes

Para estudiar la contribución del estrés oxidativo sobre las alteraciones inducidas por CIH las ratas fueron tratadas con distintos antioxidantes.

Se administró diariamente ácido ascórbico (1,25 g/L) en el agua de bebida como agente antioxidante, durante la exposición a CIH. La solución antioxidante no presenta cambios de sabor con respecto al agua sin ácido ascórbico. La suplementación del agua de bebida con ácido ascórbico no cambia el consumo de agua de la rata. Los bebederos fueron protegidos de la luz par evitar la oxidación del ácido ascórbico.

Además se utilizó mito-TEMPO (0,7 mg/kg por día), un antioxidante que se acumula específicamente en la mitocondria, y Ebselen (10 mg/kg por día) cuyos efectos van dirigidos específicamente contra el radical ONOO⁻. Ambos antioxidantes fueron administrados usando bombas osmóticas subcutáneas (2ML4, Alzet, USA). En los estudios de descarga quimiosensorial, las bombas fueron implantadas en las ratas 48 horas antes de ser expuestas a CIH. En el caso de los experimentos de medición de presión arterial, las

bombas osmóticas con Ebselen fueron implantadas una vez que las ratas presentaban hipertensión (7 días de CIH), y se les dio un día de descanso antes de continuar con el protocolo de CIH. En todos los casos, luego de la implantación de bombas osmóticas, los animales fueron tratados de forma aguda, post cirugía de implantación, con analgésicos y antibióticos (ketoprofeno 1% y enrofloxacina, respectivamente). Además, se realizaron controles con ratas que fueron implantadas con bombas osmóticas con el vehículo en el que fue disuelta cada una de las drogas. En el caso del MitoTEMPO se usó suero fisiológico (NaCl, 0,9%), y para Ebselen se utilizó DMSO (80% en suero fisiológico estéril).

3.2 Registro de la descarga quimiosensorial del CB de rata *in situ*.

Las ratas expuestas a CIH y los controles *sham* se anestesiaron con 40 mg/kg de pentobarbitona de sodio, i.p., y se colocaron en posición supina sobre una mesa de cirugía. El animal se mantuvo a 37-38°C durante la duración del registro utilizando mantas calefactoras. Se realizó una traqueostomía y se expuso la bifurcación de la arteria carótida. Se disecó el nervio carotídeo hasta la unión con el nervio glossofaríngeo y se seccionó el nervio glossofaríngeo en la región distal a la unión con el nervio carotídeo, el que se disecó del tejido circundante. El nervio carotídeo (~40 µm de diámetro) se colocó sobre un par de electrodos de Platino-Iridio de 50 µm de diámetro para el registro bipolar de la actividad quimiosensorial del CB. Se estudió la respuesta quimiosensorial a distintos niveles de O₂ (PO₂ ~ 5 a 670 mmHg). La señal registrada desde el nervio carotídeo fue pre-amplificada, amplificada y filtrada (10 Hz – 1 kHz; filtro de línea de 50 Hz) y se ingresó a una ventana electrónica que permite la discriminación de los potenciales de acción por sobre el nivel de

ruido. La ausencia de actividad eléctrica frente a un estímulo hiperóxico ($PO_2 \sim 670$ mmHg) fue utilizada como control para determinar si la actividad eléctrica registrada correspondía a actividad quimiosensorial carotídea. Los potenciales seleccionados se contaron y expresaron como frecuencia de descarga quimiosensorial (f_γ), en Hz. Los datos se adquirieron usando un sistema análogo-digital Power Lab (AD Instruments).

3.3 Análisis de *Western blot*.

Los tejidos (CBs, glándulas o médulas adrenales y ganglio cervical superior) fueron aislados quirúrgicamente y puestos en *buffer* de lisis (HEPES 20 mM, pH=7,2; EGTA 1 mM; manitol 210 mM; sacarosa 70 mM), con una mezcla de inhibidores de proteasa 2% (Sigma), luego fueron homogenizados por sonicación a 4°C, y luego fueron congelados a -80°C. La concentración de proteínas fue determinada usando un kit de medición de proteínas basado en el método de Lowry (Bio-Rad). Al momento de la medición, las proteínas extraídas fueron mezcladas con solución de carga (LDS 4x, Invitrogen), fueron hervidas por 5 minutos, y fueron cargadas y separadas en geles de poli-acrilamida al 10% (NuPAGE, Invitrogen). Luego fueron transferidas a membranas de PVDF en un sistema de transferencia en seco (iBlot, Invitrogen). El bloqueo de las uniones inespecíficas de la membrana se realizó con BSA 5% en tampón fosfato (PBS) y con Tween-20 0,1%, por 2 horas a temperatura ambiente. La membrana fue incubada con anticuerpos contra MnSOD (1:200, #06-984, Millipore), CuZnSOD (1:200, #574597, Calbiochem), 3-NT (1:500, #A21285, Molecular Probes), a 4°C por 12 horas. Luego la membrana fue incubada durante una hora, con un anticuerpo secundario acoplado a HRP (1:5000, Sigma) contra ratón, conejo o cabra, dependiendo de la especie en donde se generó cada anticuerpo primario.

Finalmente la membrana fue lavada y revelada en films fotográficos mediante un kit de luminol (Thermos). La densidad de las bandas detectadas en cada *immunoblot* fue integrada y analizada utilizando el programa ImageJ.

3.3.1 Co-inmunoprecipitación de MnSOD nitrada.

Para la co-inmunoprecipitación realizada en médulas adrenales se tomaron homogenizados de 5 médulas adrenales por grupo, fueron puestos en buffer de lisis con 2% de inhibidor de proteasas, homogenizados en sonicador y se cuantificaron las proteínas por el método de Lowry. Luego 400 µg de proteína por grupo fueron incubados con 20 µl de microesferas de agarosa acoplados a un anticuerpo anti-3-NT por 12 horas a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas a 4°C, a 14.000 g por 5 minutos, dos veces sucesivas. Luego se retiró el sobrenadante, y el precipitado restante, que contiene el purificado de proteínas nitradas, fue lavado 3 veces re-suspendiendo en 100 µl de PBS y centrifugado a 14.000 g. Luego, el precipitado final fue re-suspendido en 50 µl de solución de carga 2x, se hirvieron las muestras por 5 minutos y se continuó con el protocolo antes expuesto para realizar un *Western blot* contra MnSOD, y detectar los niveles de MnSOD nitrada en las médulas adrenales. Después se realizó el control inverso en donde se inmunoprecipitó toda la MnSOD y se realizó un *immunoblot* contra 3-NT. Para esto se homogenizaron y se tomaron 50 µl de *Dynabeads* acoplados a proteína A (Life Technologies, # 10002D), que fueron puestos en otro tubo y separados usando un imán. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió en 200 µl de anticuerpo anti MnSOD (1:20) preparado en PBS con 0,1% Tween-20, y se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Usando el magneto se separaron los *Dynabeads* unidos al anticuerpo anti- MnSOD y se incubaron con 200 µl de homogenizados de médulas adrenales por grupo, por 12 horas a 4°C. Con el imán se separó el complejo *Dynabead*-anticuerpo anti MnSOD-antígeno y se resuspendió en 200 µl de

PBS con 0,1% Tween-20. Se vuelve a separar con el imán y se resuspende en 20 μ l de solución de elución (glicina 50 mM, pH 2,8). Se agregaron 10 μ l de solución de carga 4x se hirvieron por 10 minutos y se separaron los *dynabeads* del purificado de MnSOD. El sobrenadante fue cargado en geles de poli-acrilamida y se realizó el *Western blot* contra 3-NT siguiendo el protocolo explicado en la sección anterior.

Para evaluar la nitración de la MnSOD en los CBs se realizó una estrategia experimental similar, pero se prepararon homogenizados de CBs extraídos de 12 ratas por grupo y se incubaron 200 μ g de proteína iniciales por grupo.

3.4 Preparación de los tejidos para inmunohistoquímica.

Las ratas expuestas a CIH y los controles *sham* se anestesiaron con pentobarbitona sódica (40 mg/kg i.p.) y se perfundieron a través del ventrículo izquierdo con 300 ml de PBS frío y luego con 300 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS. De los animales fijados, se extrajeron las glándulas adrenales, los ganglios cervicales superiores y las bifurcaciones carótidas y se post-fijaron en PFA al 4% en PBS por 12 horas a 4°C. Posteriormente, las muestras se deshidrataron en una batería de alcoholes de concentraciones crecientes y se incluyeron en paraplast. Los tejidos se cortaron en cortes de 5 – 8 μ m de espesor y se montaron en portaobjetos silanizados. A los cortes histológicos previamente desparafinados, se les realizó un proceso de recuperación antigénica para exponer los sitios de unión al anticuerpo. Para esto los cortes fueron expuestos a dos ciclos de 4 minutos cada uno a 90°C (700W) en un microondas en solución de citrato 0,1 M y llevado a pH 6,0 con hidróxido de sodio. Luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se trataron con una solución de H₂O₂ al 0,1% para inhibir la reacción de la peroxidasa

endógena. El bloqueo de los sitios de unión inespecífica se realizó incubando las muestras en una solución de bloqueo universal (ABC, Vectastain kit, Vector) por 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. A continuación los cortes se incubaron con uno de los siguientes anticuerpos: contra MnSOD (1:200, #06-984, Millipore), CuZnSOD (1:200, #574597, Calbiochem), 3-NT (1:500, # A21285, Molecular Probes), por 12 horas en una cámara húmeda a 4°C. Luego las muestras fueron tratadas con un kit de biotina-estreptavidina peroxidasa (ABC, Vectastain kit, Vector) y reveladas mediante 5 minutos de incubación en 3'3 diaminobenzidina tetrahidrocloreuro (DAB) a 35°C. Finalmente las muestras fueron deshidratadas y contra teñidas con hematoxilina de Harris por 5 minutos y montadas en medio de montaje permanente para ser observadas en el microscopio de luz. El control negativo se obtuvo realizando el mismo proceso, pero omitiendo el anticuerpo primario. Para el análisis y cuantificación de la marca inmunorreactiva, se obtuvieron imágenes mediante una cámara CCD conectada a un microscopio (Olympus CX31).

3.4.1 Cuantificación de la inmunorreactividad positiva.

El análisis de la marca inmunorreactiva se realizó mediante un algoritmo de deconvolución del color que separa específicamente la tinción que proviene de la hematoxilina y de la DAB usando el software ImageJ (Ruifrok & Johnston, 2001). Este algoritmo deconvoluciona los colores de las imágenes adquiridas en RGB por la cámara CCD y calcula la contribución de cada una de las tinciones utilizadas en la muestra. Para la cuantificación se usó el promedio de la marca inmunorreactiva positiva tomada de 4 campos de $9.200 \mu\text{m}^2$ cada uno para los CBs, y $5.038.848 \mu\text{m}^2$ para cada campo capturado desde las médulas adrenales en dos cortes por rata.

3.5 Cuantificación del NO producido por los CBs

Se extrajeron quirúrgicamente CBs de ratas *sham* y sometidas a CIH y fueron colectados en solución *Tyrode* pH 7,4, libre de calcio y equilibrado con 100% O₂ (en mM: 154 Na⁺, 4,7 K⁺, 1,1 Mg²⁺, 120 Cl⁻, 23,2 Glutamato, 21 HCO₃⁻, 5,5 Glucosa y 5 HEPES). Luego se incubaron los CBs por 5 minutos con *Tyrode* regular (en mM: 154 Na⁺, 4,7 K⁺, 2,2 Ca²⁺, 1,1 Mg²⁺, 120 Cl⁻, 21 Glutamato, 21 HCO₃⁻, 5,5 Glucosa y 5 HEPES) pero equilibrado con O₂ 20% y CO₂ 5%. Se tomó el medio de incubación normóxico (20% O₂) y se midió la producción de NO usando un equipo de detección por quimioluminiscencia (Sievers 280), que detecta el NO producido a partir de la reducción de nitritos a NO.

3.6 Medición de la actividad de MnSOD

Para medir la actividad de la MnSOD, CBs de 12 ratas por grupo, fueron homogenizadas por sonicación en *buffer* de lisis (HEPES 20 mM, pH=7,2; EGTA 1 mM; manitol 210 mM; sacarosa 70 mM) y congelados a -80°C. Al momento de realizar el ensayo, los homogenizados fueron incubados con 3mM de NaCN para inhibir las otras isoformas de la SOD, y cuantificar sólo la actividad de la MnSOD. Se utilizó un *kit* comercial (#706002, Cayman) que usa la sal de tetrasolio para la detectar la degradación del radical O₂⁻ por parte de la MnSOD y se realizó el ensayo según las instrucciones del fabricante.

3.7 Análisis estadístico

Los datos fueron expresados como las medias y están graficadas las desviaciones estándar de cada grupo. Como test estadísticos se usaron t student, ANOVA de una o dos vías, y los test *post hoc* tal como es señalado en las leyendas de las figuras.

4. RESULTADOS

4.1 Medición de los niveles de SOD.

4.1.1 Niveles de SOD en glándulas adrenales.

Estudiamos los cambios de los niveles proteicos de MnSOD inducidos por CIH en homogenizados de glándulas adrenales completas, y encontramos en ratas sometidas a 7 días de CIH, un aumento significativo de los niveles de MnSOD (Fig. 3A y 3B). Cuando quisimos confirmar estos resultados mediante técnicas inmunohistoquímicas, encontramos que el aumento de los niveles de MnSOD inducido por CIH (Fig. 4B), sólo ocurre en algunas zonas de la corteza suprarrenal. De hecho, el aumento de MnSOD es evidente en la zona glomerulosa, donde células epiteliales producen mineralocorticoides como la aldosterona, y en la zona reticularis, donde se producen andrógenos como la testosterona. La marca inmunorreactiva para MnSOD está presente, aunque en menor medida, en la zona fasciculata, cuyas células producen glucocorticoides (cortisol); y en la médula de la glándula adrenal, que contiene células cromafines que producen catecolaminas, entre ellas la epinefrina y la noradrenalina (Fig. 4C).

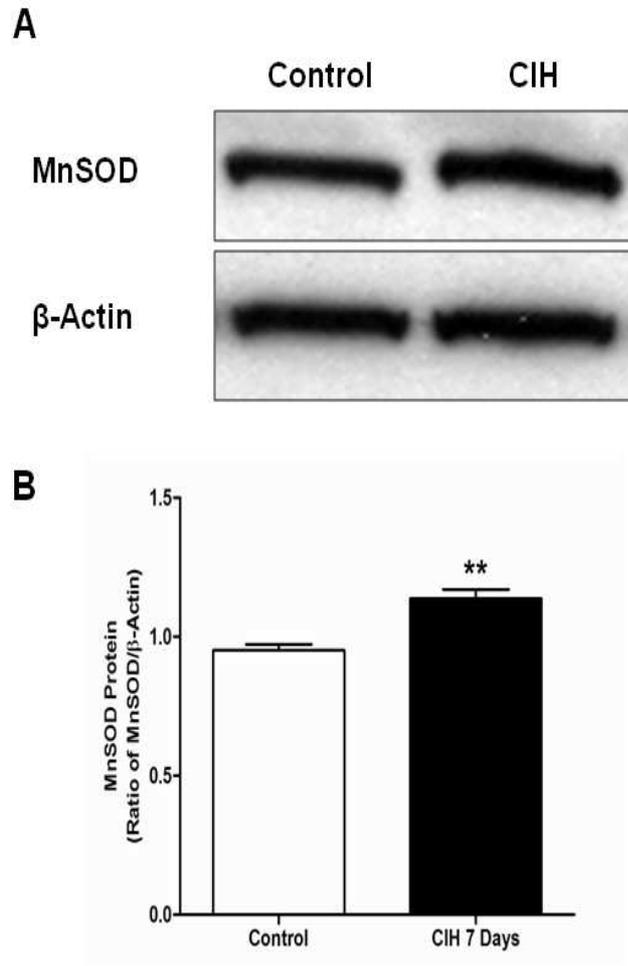


Figura 3. La CIH por 7 días aumenta los niveles de MnSOD en glándulas adrenales de rata. A, Ensayos de *Western blot* contra MnSOD en homogenizados de médulas adrenales completas. B, Análisis semi-cuantitativo de los inmunoblot. ** $P < 0,01$, Test de Student, control $n = 4$ y CIH $n = 3$ ratas.

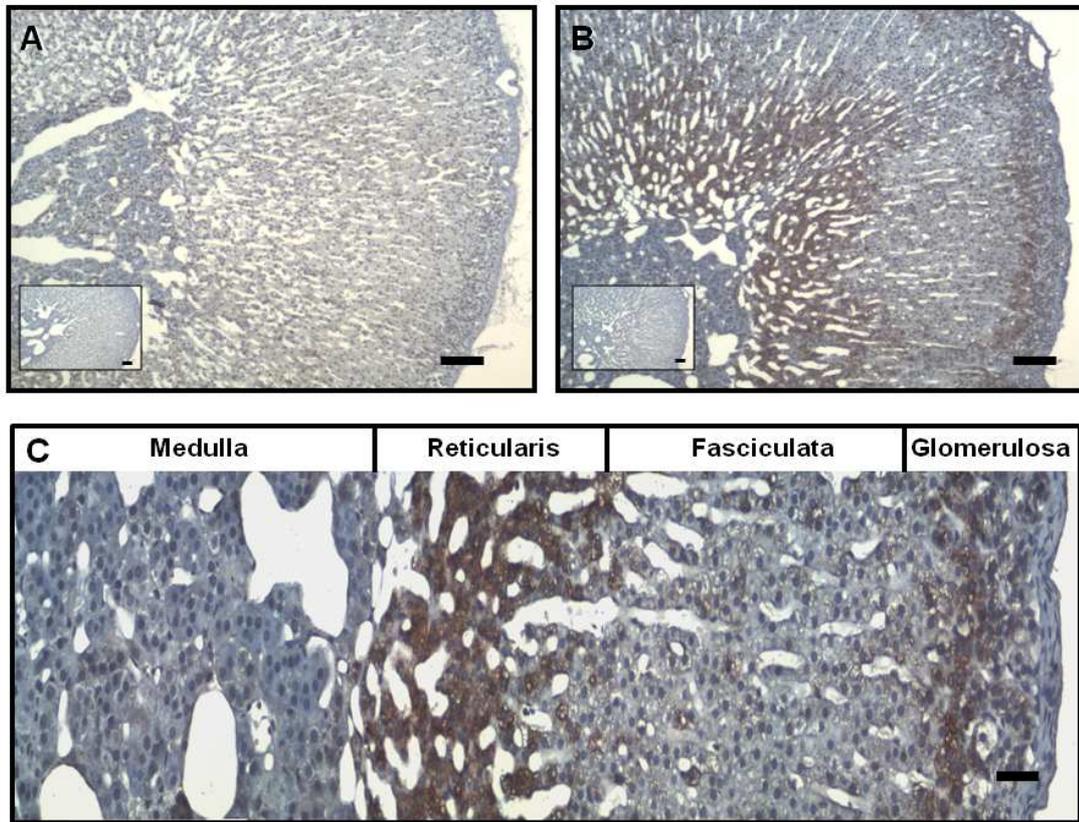


Figura 4. Inmunorreactividad contra MnSOD en glándulas adrenales de ratas sometidas a CIH. Fotomicrografías muestran los niveles de MnSOD en una rata control (A) y en una rata sometida a CIH (B). La reconstrucción realizada con tres fotografías tomadas a mayor aumento desde el corte extraído de la rata CIH, permite distinguir los niveles de MnSOD en las distintas zonas de la glándula adrenal (C). A y B, barra 100 μm , insertos muestran los controles negativos sin inclusión del anticuerpo primario; C, Barra 20 μm .

Para estudiar los niveles de MnSOD en las células cromafines presentes sólo en la médula adrenal, las aislamos quirúrgicamente bajo lupa, separándolas de la corteza suprarrenal. Estudiamos los niveles de la MnSOD y de la CuZnSOD en los homogenizados de médula adrenal, mediante *Western blot*. Observamos que la exposición a 7 días de CIH no produjo cambios en los niveles de ninguna de las dos proteínas estudiadas en las médulas adrenales (Fig. 5). Luego, para evaluar el potencial rol de las ROS inducidos por CIH, sobre los niveles de MnSOD y CuZnSOD, estudiamos los efectos del antioxidante ácido ascórbico (1.25 g/L) suplementado en el agua de bebida sobre los niveles de estas dos proteínas. En las médulas adrenales de rata, el tratamiento con ácido ascórbico no modificó los niveles de las SODs en animales sometidos a CIH (Fig. 5). Estos resultados muestran que la exposición a CIH no altera los niveles proteicos de MnSOD o de CuZnSOD en la médula adrenal.

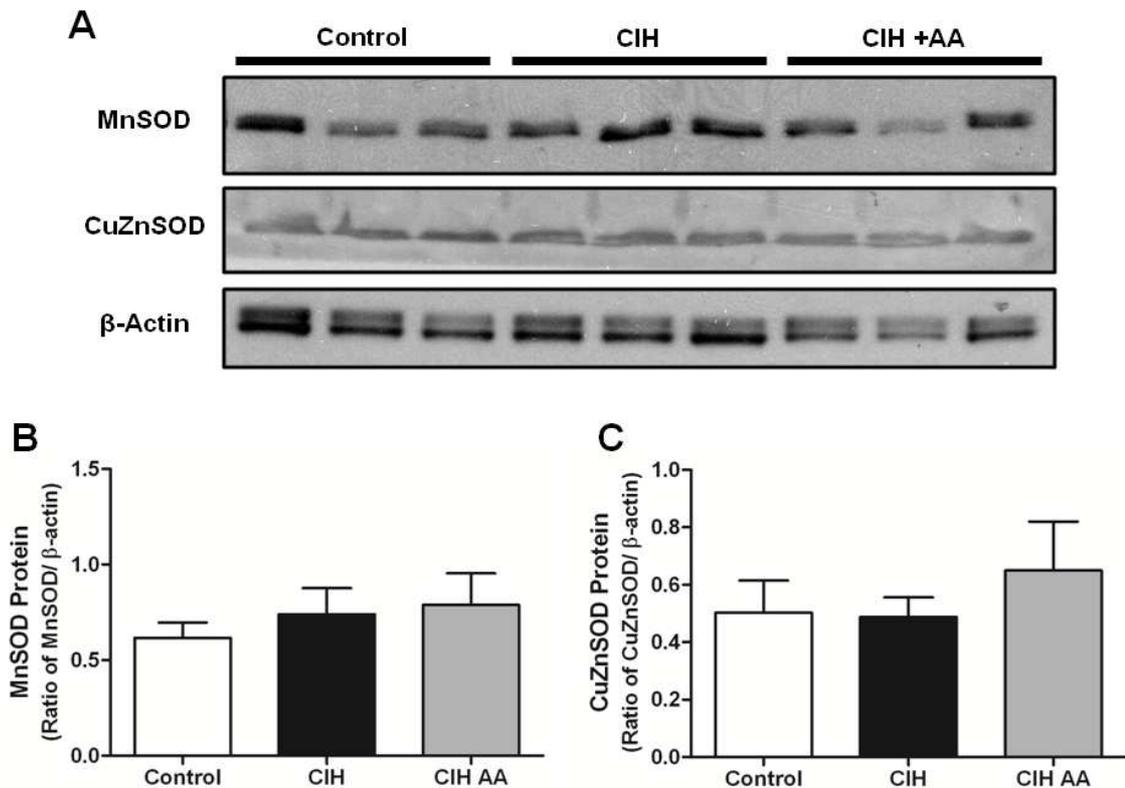


Figura 5. La CIH no produce cambios en los niveles de MnSOD y CuZnSOD en médulas adrenales de ratas. A. *Inmunoblot* muestra los niveles de MnSOD (A, panel superior), y CuZnSOD (A, panel central) en homogenizados de médulas adrenales de ratas sometidas a condiciones control, CIH o expuestas a CIH y suministradas con ácido ascórbico (CIH AA, 1,25 g/L). B y C, Análisis semicuantitativo de los niveles de proteína estandarizado contra β -Actina. ANOVA de una vía, sin diferencias significativas, $n = 5$ para control y CIH, $n = 4$ para el grupo CIH AA.

4.1.2 Cuantificación de los niveles de SOD en cuerpos carotídeos.

Después de determinar los efectos de CIH sobre los niveles de MnSOD y CuZnSOD en las médulas adrenales, estudiamos los niveles de estas enzimas en los CBs, para determinar si la exposición a CIH produce cambios sobre los niveles de SOD en las células glómicas o en otras células del CB.

Determinamos con técnicas inmunohistoquímicas, los niveles de MnSOD en CBs extraídos de ratas que fueron sometidas a condiciones control o expuestas a CIH por 3, 5 y 7 días; y encontramos que la exposición a CIH aumentó los niveles de MnSOD. La enzima se encuentra principalmente en las células glómicas; la marca inmunorreactiva es claramente identificable en los nidos (*clusters*) de células glómicas (Fig. 6B, 6C y 6D). En el caso de los CBs de ratas controles, la marca también está presente en las células glómicas, aunque en menor grado (Fig. 6A). A pesar de que la MnSOD está presente en las células glómicas, no podemos descartar la presencia de MnSOD en otros tipos celulares como en células sustentaculares, endoteliales o en los terminales nerviosos. Dado que la MnSOD está en las mitocondrias, es claramente observable un patrón punteado de inmunorreactividad (flechas blancas en Fig. 6B, 6C y 6D).

Realizamos una deconvolución de las imágenes obtenidas, y cuantificamos la marca inmunorreactiva contra MnSOD. Encontramos un aumento significativo de la inmunorreactividad de MnSOD (MnSOD-ir) luego de 5 días de exposición a CIH, aumento que es aún mayor en ratas sometidas a 7 días de CIH (Fig. 6E).

Los resultados obtenidos por inmunohistoquímica se confirmaron mediante *Western blot*. Para esto, utilizamos homogenizados de CBs de 20-24 ratas, y encontramos que la exposición a CIH por 7 días produce un aumento significativo de los niveles de MnSOD en los homogenizados de CB, comparado con homogenizados de CBs extraídos desde ratas controles (Fig. 7).

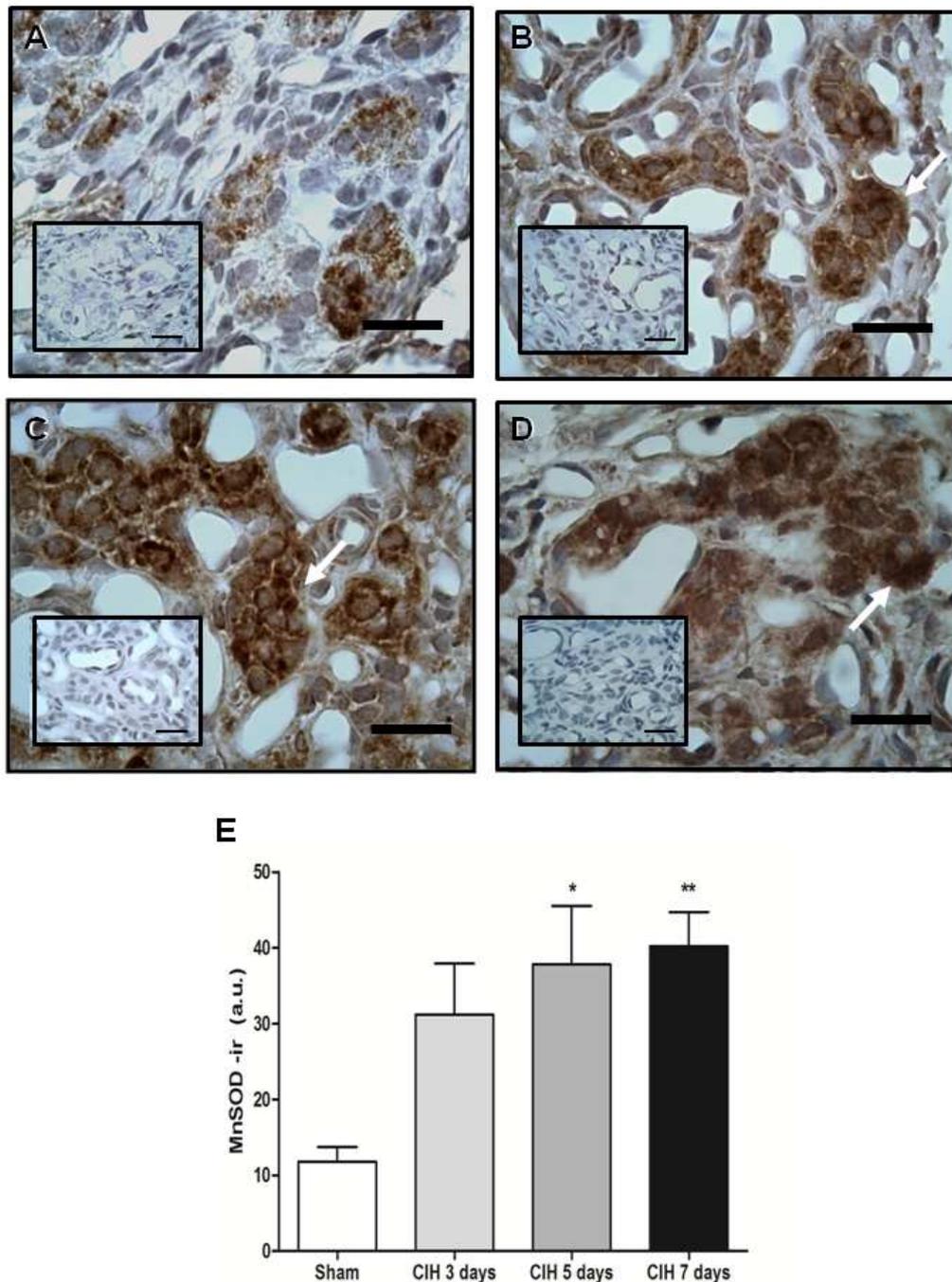


Figura 6. La CIH incrementa la inmunorreactividad de MnSOD en cortes de CBs extraídos de ratas sometidas a CIH. Las imágenes muestran el aumento de la inmunorreactividad contra MnSOD (MnSOD-ir) al comparar una rata control (A), con ratas que fueron sometidas a 3, 5 y 7 días de CIH (B, C y D respectivamente). La MnSOD-ir está presente principalmente en las células glómicas (flechas blancas). E, Cuantificación de la MnSOD-ir. En A, B, C y D inserto corresponde a los controles negativos realizados en las mismas condiciones, pero sin incluir el anticuerpo primario; barra 20 μm . En E, Sham n = 6; CIH 3 days n = 4; CIH 5 days n = 4; CIH 7 days n = 4. Bonferroni luego de ANOVA de una vía, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ vs. sham.

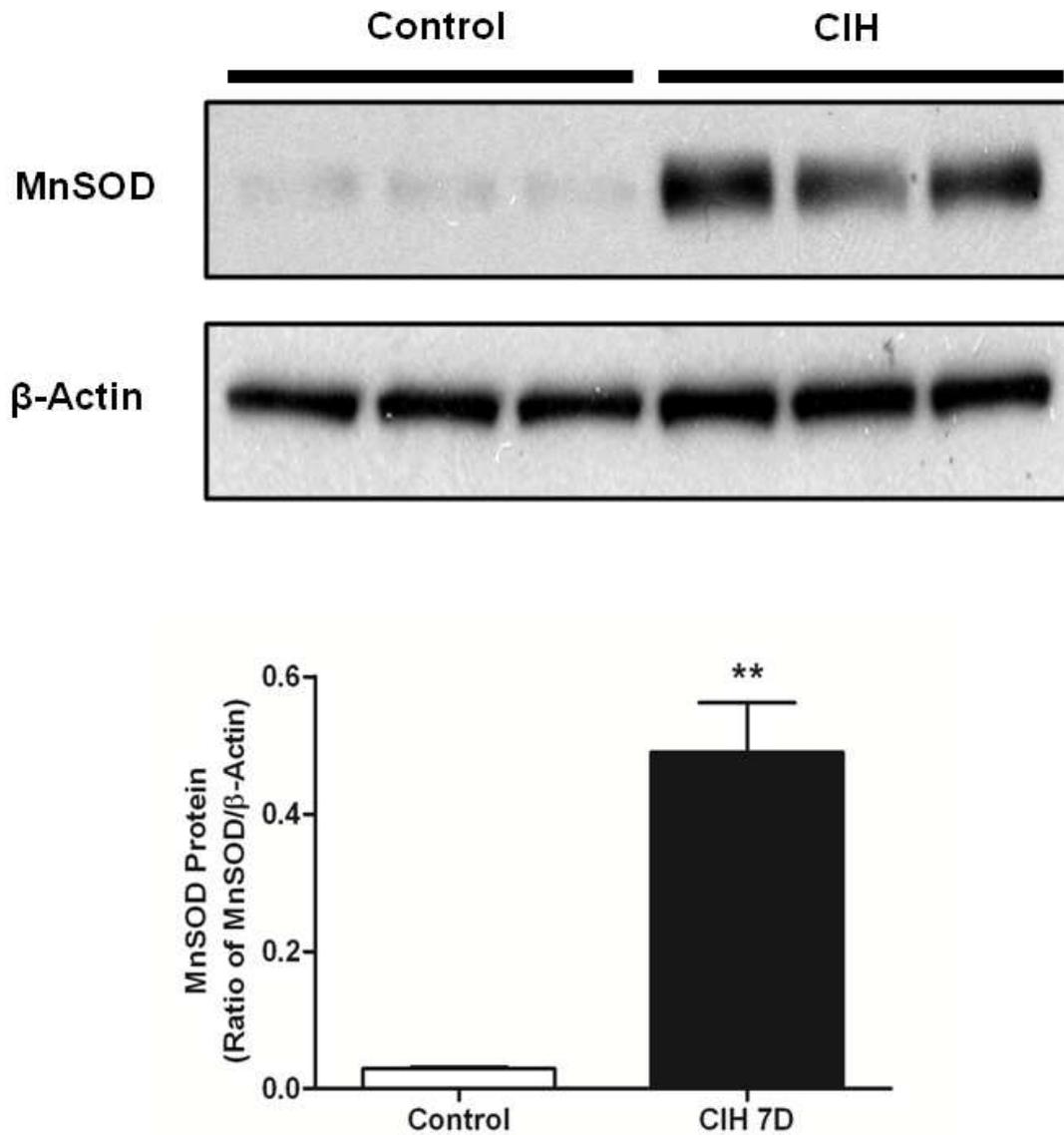


Figura 7. Cuantificación de los niveles de MnSOD en homogenizados de CB. *Western blot* realizado en homogenizados de CBs extraídos de ratas sometidas a CIH por 7 días, muestra un aumento significativo de los niveles de MnSOD en comparación a ratas control. n = 10 ratas por grupo, ** $P < 0,01$ Test de Student.

Con el objetivo de analizar el efecto de las ROS sobre los cambios de expresión de MnSOD en el CB, realizamos ensayos de *Western blot* utilizando nuevos grupos de animales, en los que se incluyó un grupo que fue sometido a CIH, pero suministrado con el antioxidante ácido ascórbico en el agua de bebida durante los 7 días del protocolo. Con estos datos, confirmamos el aumento de expresión de MnSOD en CBs de ratas sometidas a CIH y además encontramos, que el ácido ascórbico previene parcialmente el aumento de MnSOD inducido por CIH (Fig. 8).

Cuando estudiamos los niveles de CuZnSOD en CBs de rata, encontramos que la CIH no produce cambios en la cantidad de CuZnSOD presente en los homogenizados de CBs, y que al realizar el mismo experimento en animales que recibieron ácido ascórbico durante el protocolo de CIH, tampoco muestran cambios en los niveles de esta enzima (Fig. 8A y 8C). Pese a esto, decidimos observar en qué células se encuentra la CuZnSOD dentro del CB; y cuantificamos la inmunoreactividad de la CuZnSOD (CuZnSOD-ir) en cortes de CB, para poder confirmar los resultados encontrados en los ensayos de *Western blot*. Encontramos que la CuZnSOD se encuentra en las células glómicas (flechas blancas en Fig. 9A) y endoteliales del CB (flechas negras en Fig. 9A y 9B). Al realizar la cuantificación de la marca inmunoreactiva no encontramos diferencias significativas entre el grupo CIH y el grupo control (Fig. 9C, $p > 0,05$).

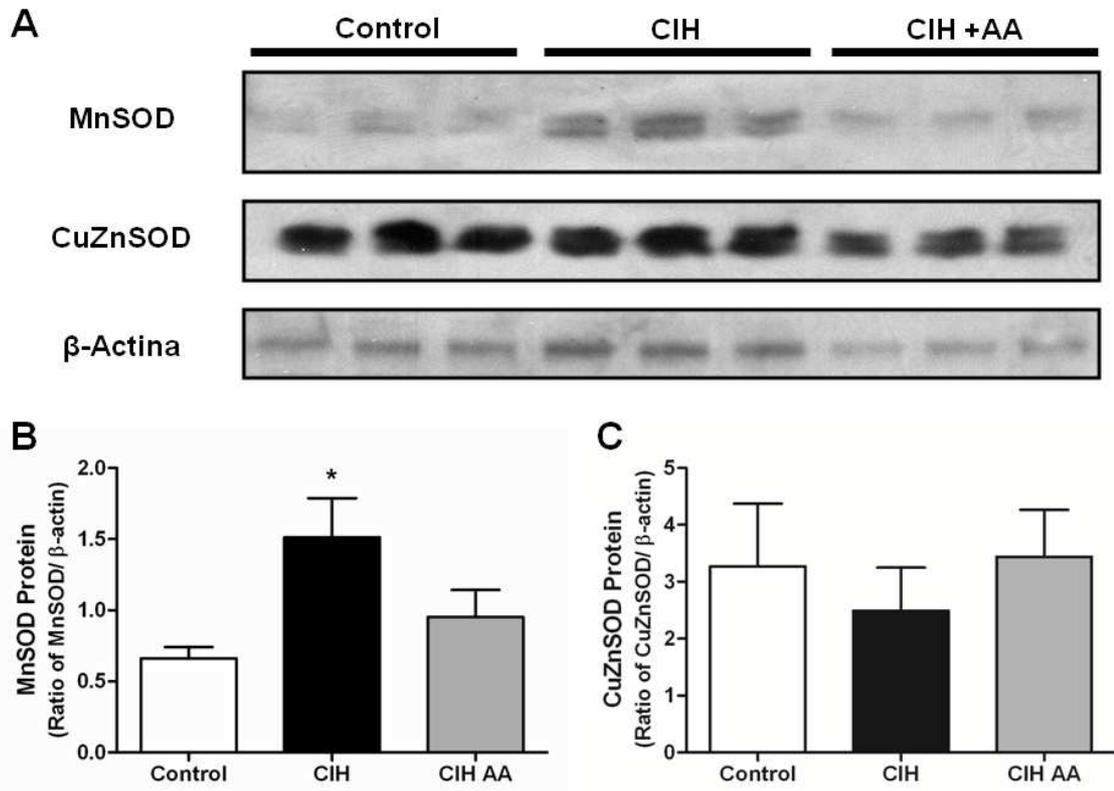


Figura 8. La CIH produce aumento de los niveles de MnSOD pero no modifica los niveles de CuZnSOD en CBs de ratas. *Immunoblot* en homogenizados de CB contra MnSOD (A, panel superior), CuZnSOD (A, panel central), en ratas sometidas a condiciones control, CIH o CIH suministradas con ácido ascórbico (CIH AA; 1,25 mg/L). Los gráficos muestran el análisis semi-cuantitativo de los niveles de MnSOD (B) y CuZnSOD (C). $n = 11-12$ ratas por grupo, * $P < 0,05$ CIH vs. Control, Bonferroni luego de ANOVA de una vía.

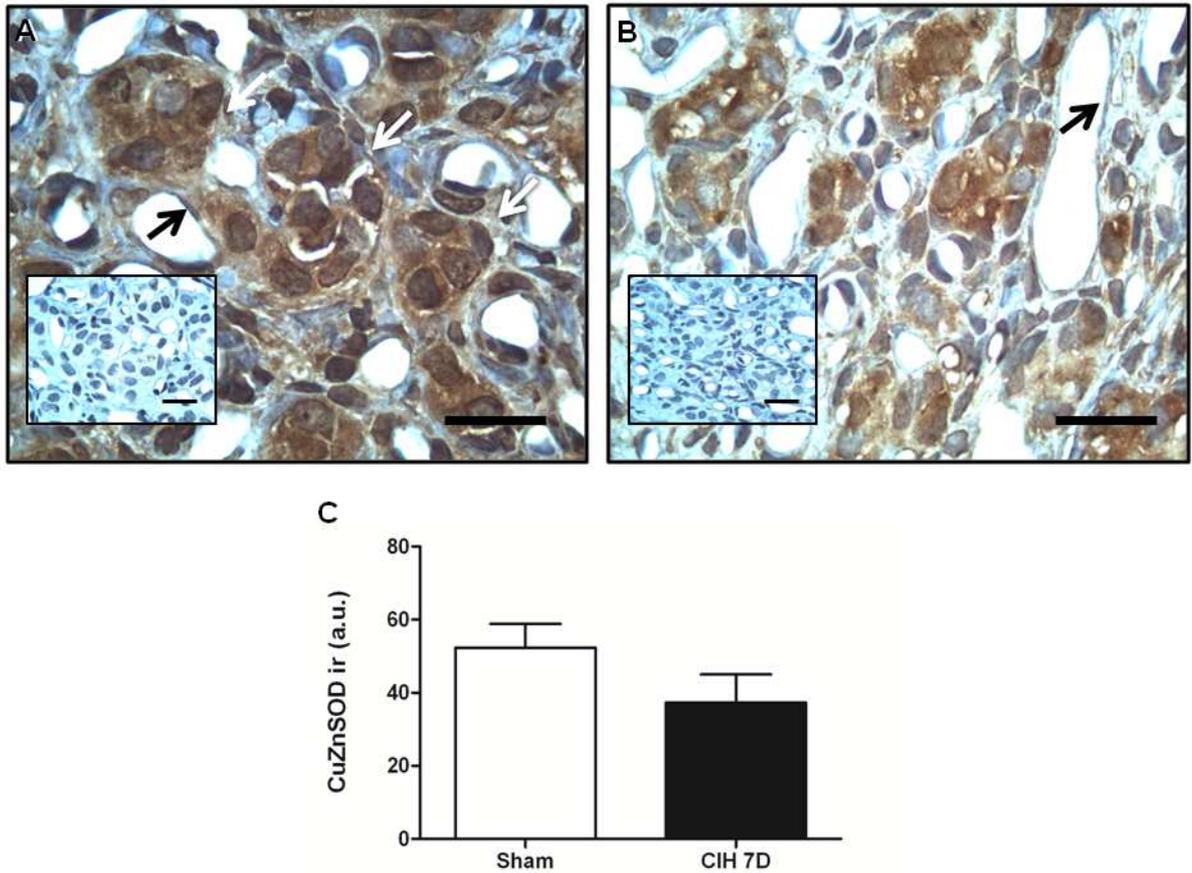


Figura 9. CuZnSOD-ir en CBs de ratas control y sometidas a CIH. Imágenes muestran la CuZnSOD-ir presente en las células glómicas (flechas blancas) en los cortes de CBs de ratas control (A) o sometidas a CIH (B). También se detectó en las células endoteliales (flechas negras). C, cuantificación de la marca inmunorreactiva. A y B, barra 20 µm. Recuadros, control negativo sin agregar el anticuerpo primario. C, n = 4 ratas por grupo; Test de Student, sin diferencias significativas.

4.1.3 Medición de MnSOD en el ganglio cervical superior.

Con el objetivo de evaluar los niveles de MnSOD en otro tejido de características similares a las células glómicas del CB, medimos los niveles de MnSOD en el ganglio cervical superior. Los somas de las neuronas ubicadas en este ganglio, comparten el mismo origen embrionario que las células cromafines de la médula adrenal y que las células glómicas del CB, y además poseen las enzimas necesarias para sintetizar catecolaminas, por lo que se esperaría que el perfil de expresión sea similar en los tres tipos de células. Sin embargo, cabe destacar que las células del ganglio cervical superior no producen respuestas celulares inmediatas a la hipoxia en animales neonatos ni en adultos, como sí ocurre con las células glómicas en adultos, o con las células de la médula adrenal de neonatos.

Así, cuando realizamos experimentos de *Western blot* en homogenizados de ganglio cervical superior, encontramos que la exposición a CIH no modifica los niveles de MnSOD (Fig. 10). Además, cuando cuantificamos la MnSOD en cortes de ganglio cervical superior por inmunohistoquímica, encontramos que ésta se encuentra presente, principalmente, en los somas neuronales del ganglio cervical superior y en menor medida, en las células gliales (Fig. 11).

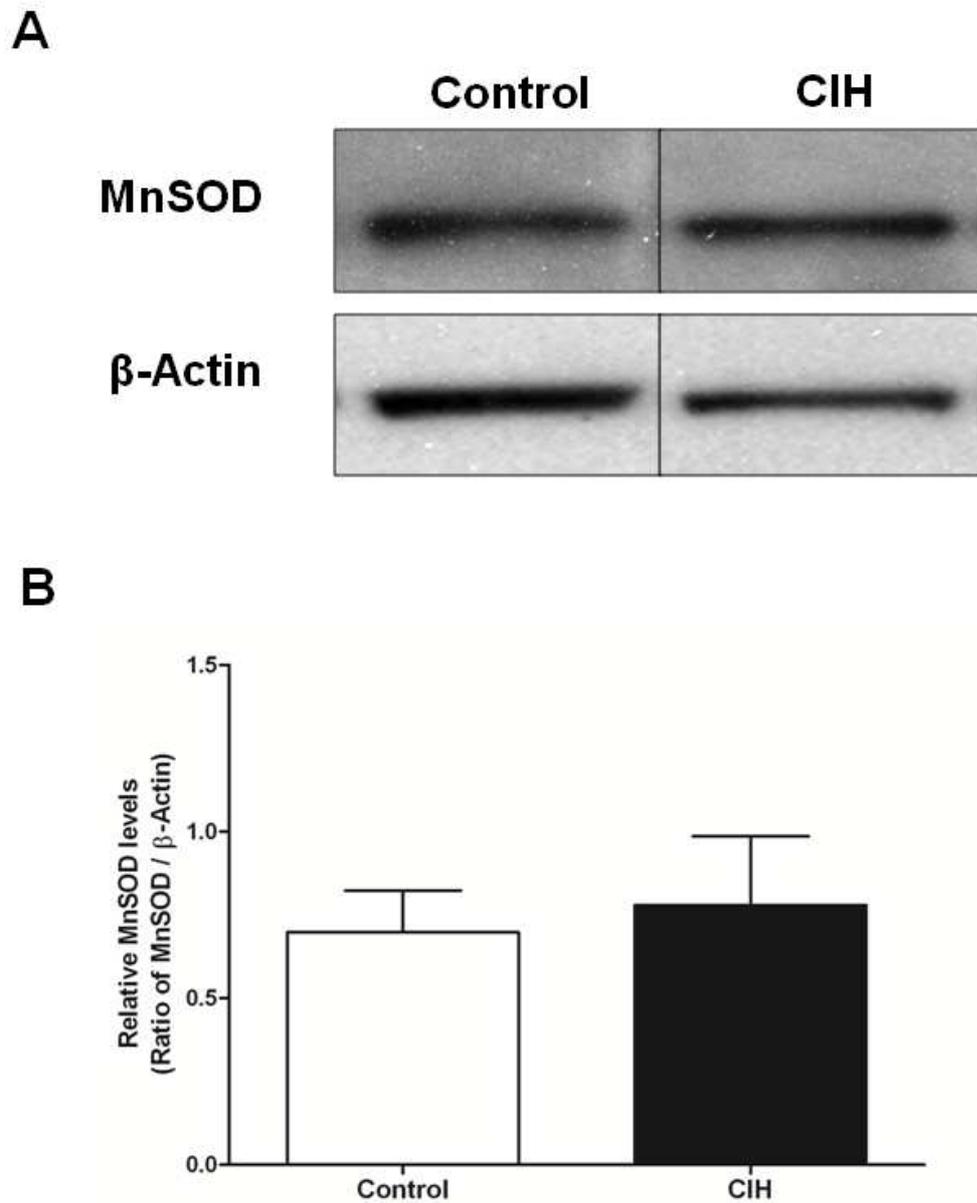


Figura 10. La CIH no genera cambios de MnSOD en el ganglio cervical superior de rata. *Western blot* realizado en homogenizados de ganglio cervical superior de rata (A). Al cuantificar la densidad óptica de las bandas obtenidas no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (B), Test de Student, sin diferencias significativas, ($P > 0,05$). Control n = 4; CIH n = 5.

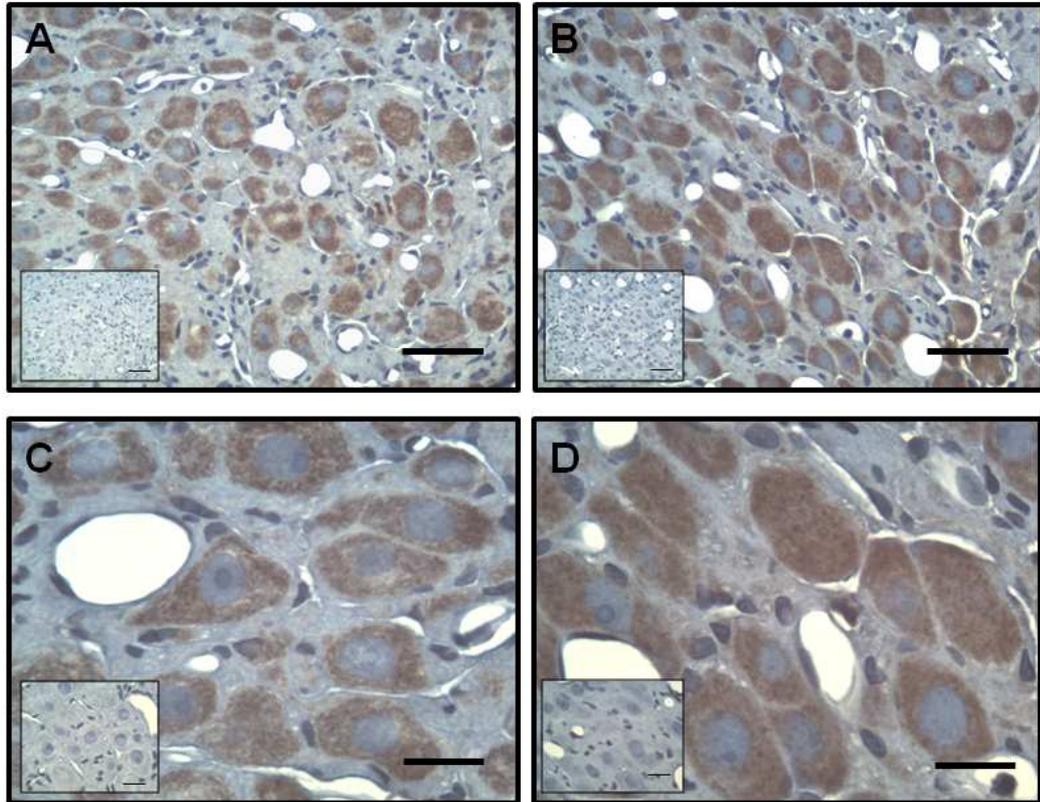


Figura 11. La CIH no cambia los niveles de MnSOD en el ganglio cervical superior. Inmunorreactividad positiva para MnSOD en ganglios de ratas control (A y B) o sometidas a CIH (C y D). A y B, barra, 50 μm ; C y D, barra 20 μm . El cuadro inferior muestra los controles negativos realizados en las mismas condiciones, pero sin incluir el anticuerpo primario.

Por lo tanto, si consideramos los tipos celulares de nuestro interés, encontramos que, la CIH produce cambios en los niveles de MnSOD sólo en el CB, y que estos cambios no ocurren en las células cromafines de la médula adrenal o en las neuronas dopaminérgicas del ganglio cervical superior (Roosen y cols. 2001), pese a que todos estos grupos celulares poseen el mismo origen embrionario. Sin embargo, la CIH sí genera cambios en los niveles de MnSOD en las regiones glomerulosa y reticular de la corteza suprarrenal, las que no tienen ningún tipo de relación ontogénica con las células derivadas de la cresta neural. Además, los niveles de CuZnSOD no están alterados ni en las células de la médula adrenal ni en las células glómicas del CB.

4.2 Cuantificación del estado redox en ratas sometidas a CIH.

Existe consenso que las ROS son fundamentales para generar el aumento de las respuestas quimiosensoriales inducidas por CIH, y que el radical O_2^- juega un papel importante en la potenciación quimiosensorial del CB (Marcus y cols. 2010, Peng y cols. 2003). Esta proposición es respaldada por los efectos de los miméticos de la SOD, que secuestran sólo el radical O_2^- , y previenen el aumento de actividad del CB inducido por hipoxia (Peng y Prabhakar 2004, Peng y cols. 2003).

Debido a lo anterior, utilicé la medición de NO y la formación de 3-NT como indicadores de las consecuencias producidas por aumentos transitorios en los niveles de ROS.

4.2.1 Medición de los niveles de óxido nítrico en homogenizados de CB.

El radical O_2^- es altamente reactivo, por lo que, es posible que otras especies reactivas formadas a partir de reacciones generadas por el radical O_2^- estén contribuyendo a la potenciación quimiosensorial.

El óxido nítrico (NO) puede reaccionar con el radical O_2^- generando otros radicales libres. Por esto, decidimos medir los niveles de NO producido, usando el método de generación de nitritos en el medio de incubación de CBs de ratas que previamente fueron sometidas a condiciones control o a 7 días de CIH. Encontramos que los CBs de ratas sometidas a CIH generan menos nitritos en comparación a las ratas control. Así mismo, cuando los CBs de ratas control fueron incubados con L-NAME (1 mM) se logró reducir la generación de nitritos aproximadamente en un 90% (Fig. 12) (datos publicados en Moya y cols. 2012).

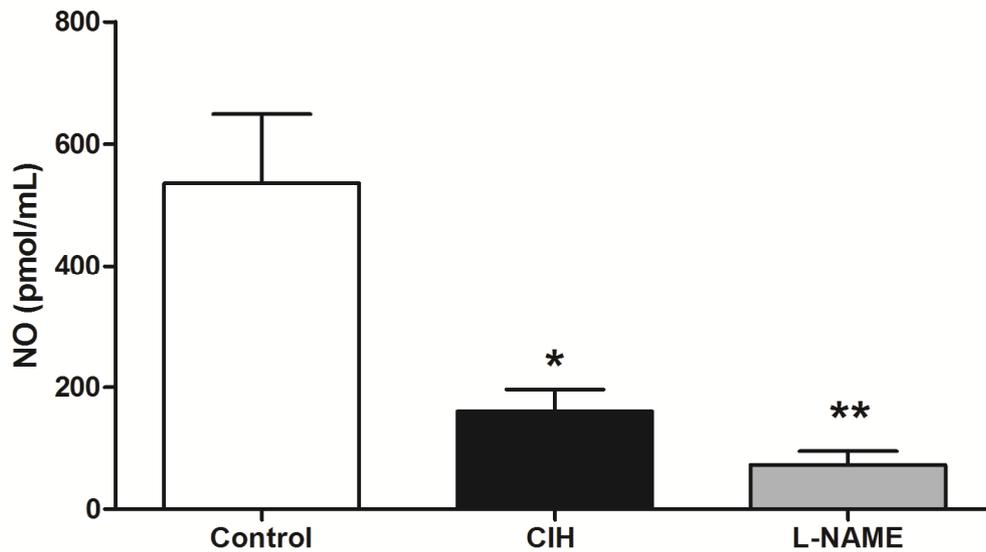


Figura 12. La CIH produce disminución de los niveles de NO generados por los CBs en el medio de incubación. La producción de NO fue medida a través de la detección de nitritos en el medio de incubación de CBs de ratas control ($n = 7$), sometidas a CIH por 7 días ($n = 6$) o sometidas a condiciones control pero incubadas con el inhibidor de las óxido nítrico sintasas L-NAME, 1 mM ($n = 5$). ** $P < 0,001$, * $P < 0,05$, Bonferroni luego de ANOVA de una vía.

4.2.2 Detección de proteínas nitradas en la médula adrenal y en el cuerpo carotídeo.

La unión del radical O_2^- con el NO genera peroxinitrito ($ONOO^-$), que puede modificar residuos de tirosina formando 3-nitrotirosinas (3-NT). Luego, la acumulación de 3-NT es un efecto directo del daño generado por estrés oxidativo.

La generación de 3-NT podría contribuir a la potenciación quimiosensorial, modificando la actividad o funcionamiento de algunas proteínas. Así, decidimos estudiar los niveles de 3-NT en las células cromafines de la médula adrenal y en las células glómicas del CB.

Realizamos inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo específico que reconoce los residuos de 3-NT en las distintas proteínas, y encontramos que en las médulas adrenales de ratas sometidas a 7 días de CIH existe un incremento de los niveles de 3-NT al ser comparados con cortes de ratas que fueron sometidas a condiciones control. Este aumento fue confirmado cuando realizamos la cuantificación de la marca inmunorreactiva (Fig. 13).

Luego realizamos ensayos de inmunohistoquímica en cortes de CB de ratas sometidas a condiciones control o a 3, 5 y 7 días de CIH. Observamos que las ratas sometidas a CIH muestran un aumento de los niveles de 3-NT (Fig. 14 B, C y D) en comparación a los CBs de ratas control (Fig. 14A). La cuantificación de la inmunorreactividad positiva contra 3-NT mostró que este aumento es significativo desde los 3 días de exposición al protocolo de CIH, y que se mantiene en animales que fueron expuestos a 5 y 7 días de CIH (Fig. 14E).

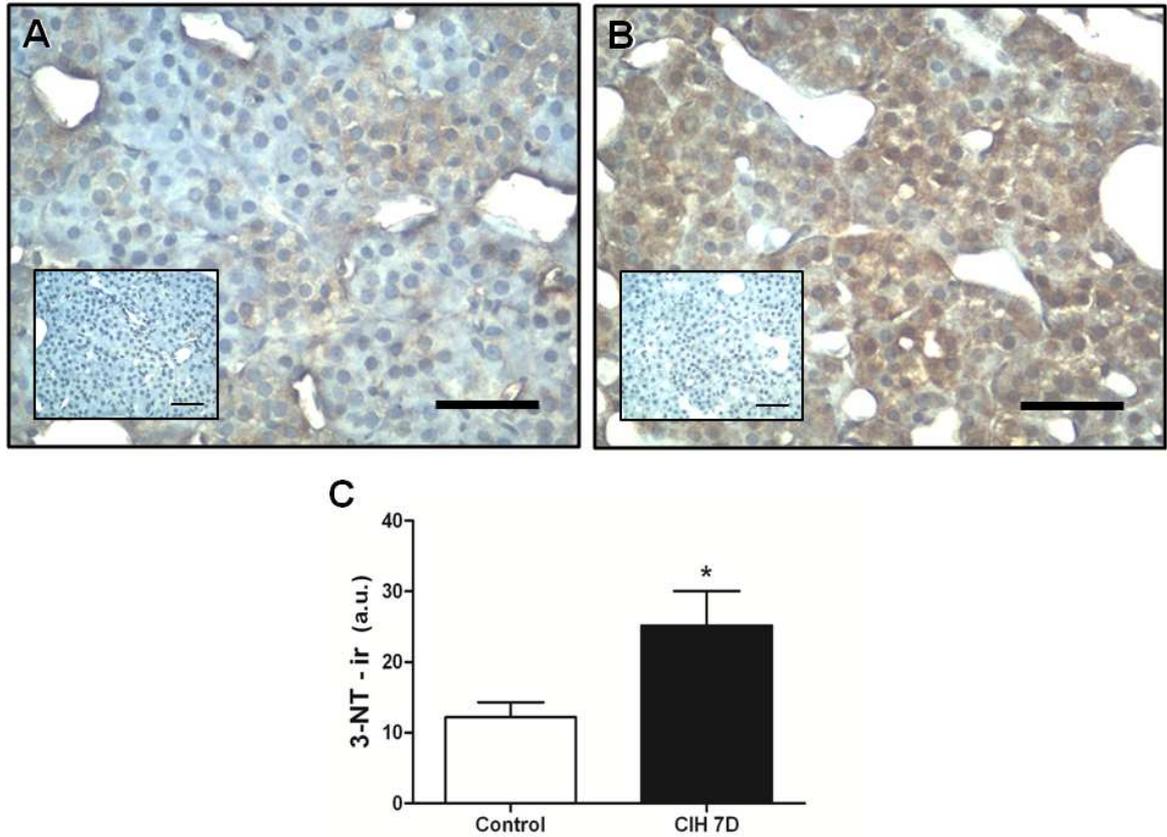


Figura 13. La exposición a CIH incrementa los niveles de 3-NT en las células cromafines de la médula adrenal. Las imágenes muestran la inmunorreactividad de 3-Nitrotirosinas (3-NT ir) en la médula adrenal de una rata control (A) y de una rata sometida a 7 días de CIH (CIH 7D) (B). La cuantificación de la 3-NT-ir muestra un aumento significativo de los niveles de 3-NT en ratas sometidas a CIH. (C). Para A y B, barra 50 µm, inserto, control negativo sin la inclusión del anticuerpo primario; para C, * $P < 0,05$, Test de Student, $n = 6$ ratas para control y $n = 7$ para CIH 7D.

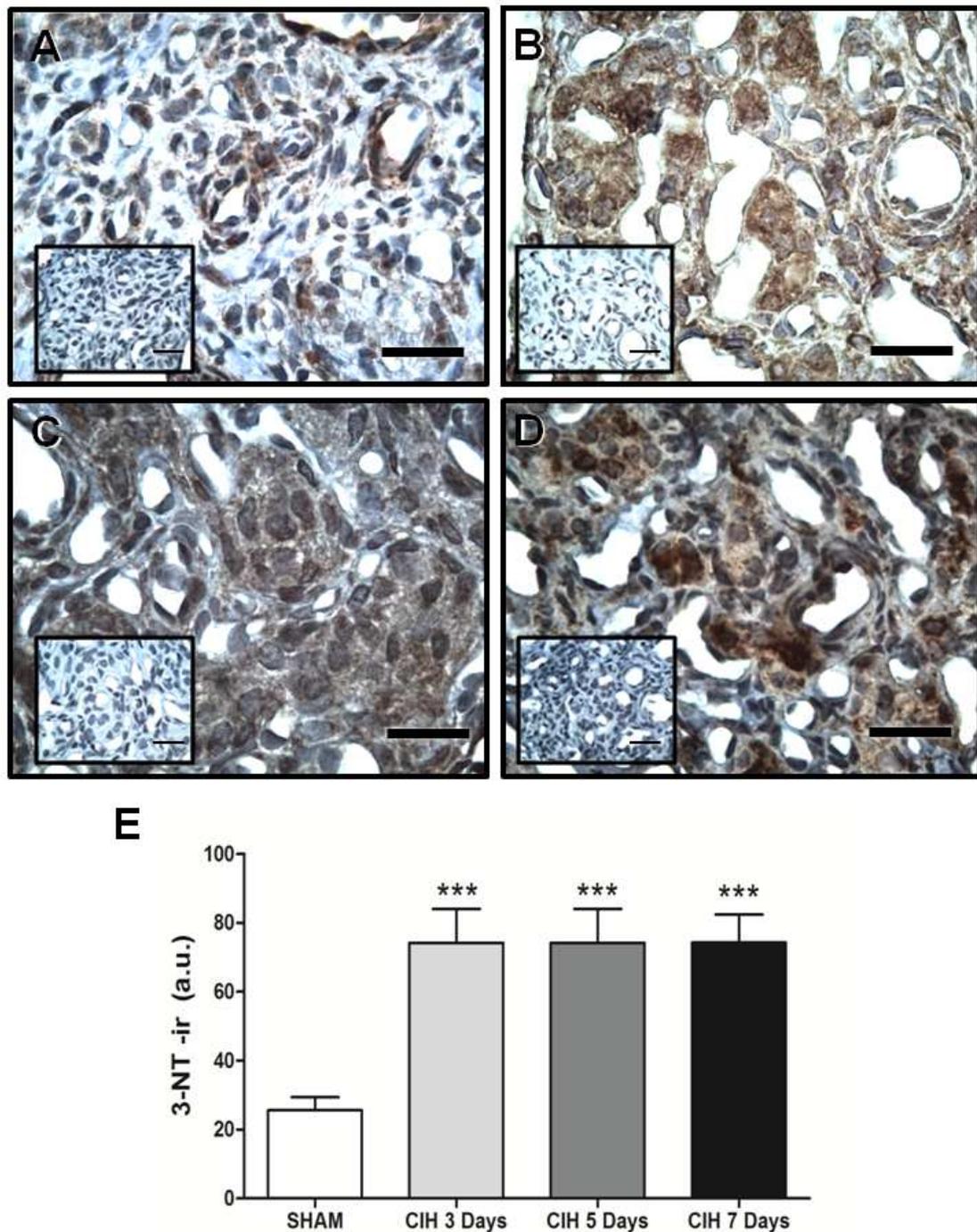


Figura 14. La exposición a CIH incrementa los niveles de 3-nitrotirosinas en CBs de rata. Immunolocalización de 3- nitrotirosinas (3-NT) en una rata sometida a ciclos de aire:aire (Sham) (A), o a 3 (B), 5 (C) y 7 (D) días de CIH. E, Cuantificación de la marca inmunorreactiva (3-NT-ir) en los distintos grupos. A-D, barra 20 µm, cuadro inferior muestra el control negativo sin incluir el anticuerpo primario. Para E, Sham n=10; CIH 3 Days n=3; CIH 5 days n=3; CIH 7 Days n=4. Bonferroni luego de ANOVA de una vía, *** $P < 0,001$ CIH vs. sham.

En resumen, luego de medir los niveles de diferentes radicales libres encontramos que la exposición a CIH disminuye los niveles de NO en los CBs de ratas expuestas a CIH en comparación con ratas control.

Ya que la reacción del O_2^- con el NO produce $ONOO^-$, y la disminución de los niveles de NO puede ser consecuencia de un aumento en la generación de peroxinitrito, decidimos estudiar los niveles de 3-NT en las células cromafines de la médula adrenal y en las células glómicas del CB. Observamos que la exposición a 7 días de CIH incrementa los niveles de 3-NT en cortes de médulas adrenales y de CBs. Más aún, en los CBs la exposición a sólo 3 días de CIH genera un aumento significativo de la marca inmunorreactiva contra 3-NT, la que se mantiene en ratas sometidas a CIH por 5 y 7 días.

4.3 Actividad de MnSOD en células cromafines de ratas expuestas a CIH.

Dado que, 1) una de las proteínas más importantes en mantener el balance oxidativo de la célula es la MnSOD; 2) que ésta enzima disminuye su actividad cuando está nitrada; y que 3) existe un incremento en la nitración de proteínas en ratas sometidas a CIH; estudiamos la actividad y nivel de nitración de la MnSOD en células cromafines de la médula adrenal y en células glómicas del CB de ratas sometidas a hipoxia intermitente.

4.3.1 Medición de la actividad de MnSOD en médulas adrenales y CBs de ratas sometidas a CIH.

Cuantificamos la actividad de la MnSOD mediante una reacción colorimétrica en homogenizados de médulas adrenales y encontramos que la actividad de la MnSOD es menor en las médulas adrenales de ratas sometidas a CIH en comparación con ratas control. Esta disminución de la actividad de la MnSOD en las médulas adrenales, es recuperada parcialmente en un grupo de animales que fue sometido a CIH pero que durante

la exposición a hipoxia, fue suplementado con el antioxidante ácido ascórbico (1,25 g/L) en el agua de bebida (Fig. 15).

Luego, realizamos un experimento similar, pero utilizando homogenizados de CBs extraídos de 11-12 ratas por grupo. Contrario a lo que esperábamos, la CIH produjo un aumento en la actividad de la MnSOD presente en los CBs, que es revertida cuando tratamos a las ratas con ácido ascórbico en el agua de bebida (Fig. 16).

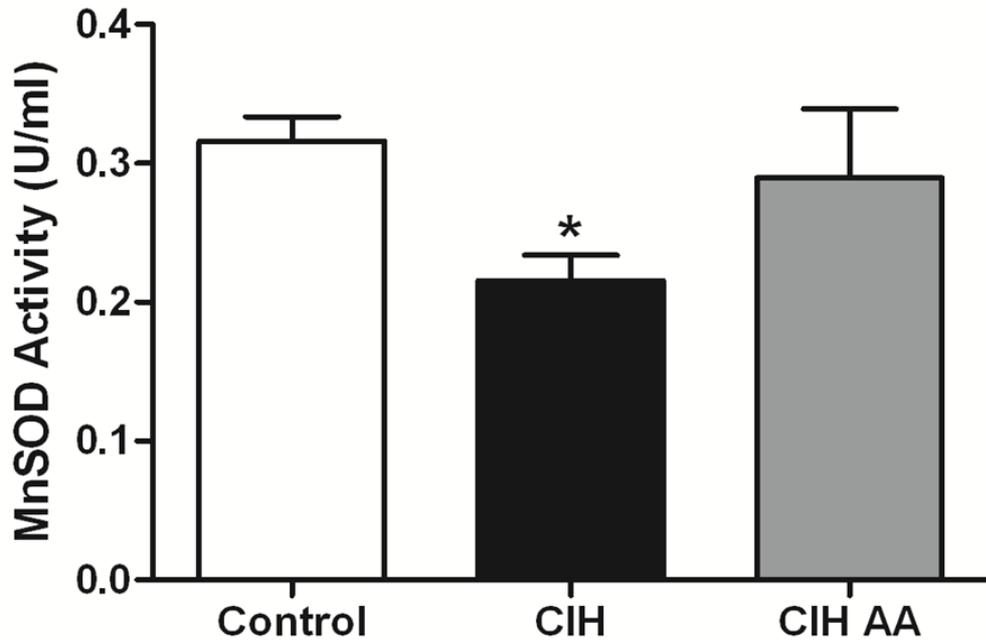


Figura 15. La CIH produce disminución de la actividad de la MnSOD en homogenizados de médula adrenal. Comparadas con las ratas control, las ratas sometidas a CIH presentan menor actividad de la MnSOD presente en homogenizados de médulas adrenales. Esta disminución es parcialmente prevenida en animales que fueron sometidos a CIH y suministrados con ácido ascórbico (CIH AA, 1,25 g/L). Bonferroni luego de ANOVA de una vía, * $P < 0,05$ CIH vs. Control. $n = 7-8$ ratas por grupo.

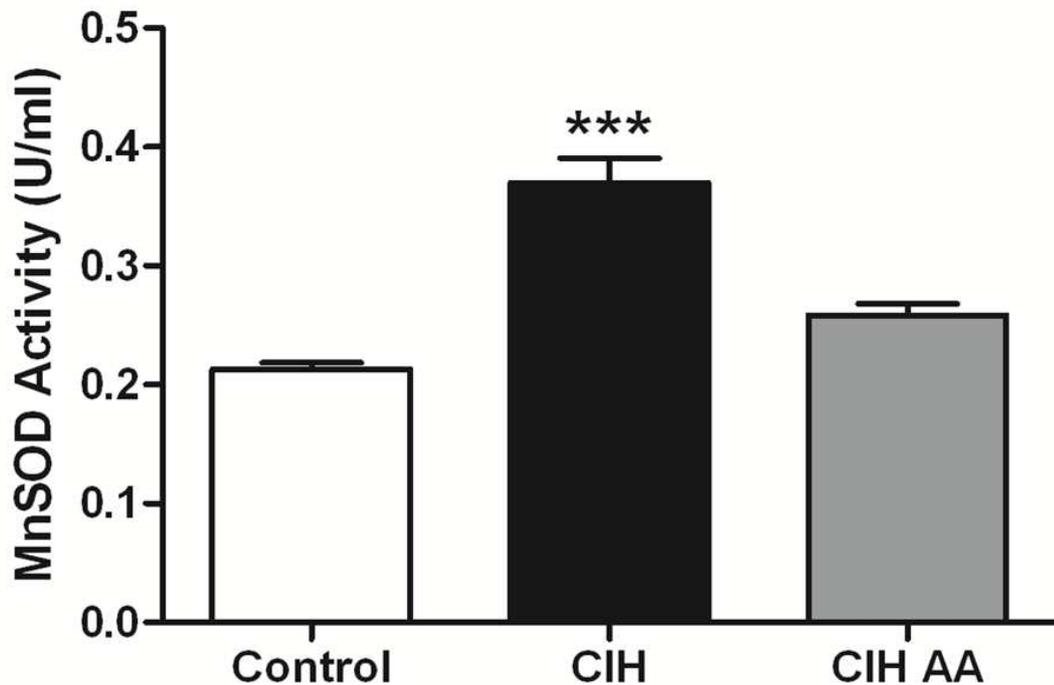


Figura 16. La exposición a CIH aumenta la actividad de la MnSOD en homogenizados de CBs de rata. Animales que fueron sometidos a CIH por 7 días presentan un aumento significativo de la actividad de MnSOD en comparación a ratas control. Este aumento es totalmente prevenido cuando administramos ácido ascórbico (1,25 g/L) durante la exposición a CIH (CIH AA). Bonferroni luego de ANOVA de una vía, * $P < 0,001$. $n = 11-12$ ratas por grupo.

4.3.2 La exposición a CIH produce nitración de la MnSOD.

Debido que observamos un aumento en los niveles de 3-NT en las células de la médula adrenal y en las células glómicas del CB, esperábamos que la CIH provocara disminución de la actividad de la MnSOD en ambos tipos celulares, pues se ha reportado que la nitración de la MnSOD genera una disminución en su actividad. Sin embargo, como fue descrito en la sección anterior, encontramos que la CIH produce una disminución de su actividad en las células de la médula adrenal, mientras que, en las células del CB, genera un aumento de la actividad de la MnSOD. El incremento de actividad en las células del CB es atribuible al aumento de los niveles de proteína observado en homogenizados de CBs de ratas sometidas a CIH, pero, cuando estudiamos los niveles de MnSOD en la médula adrenal, no encontramos alteraciones de sus niveles (Fig. 5). Luego, la disminución en la actividad de la MnSOD en las médulas adrenales no puede ser explicada por cambios en los niveles de esta proteína.

Debido a lo anterior, decidimos realizar ensayos de co-inmunoprecipitación en los que, utilizando un anticuerpo contra las 3-NTs acoplado a microesferas de agarosa, secuestramos y precipitamos todas las proteínas nitradas, y luego realizamos un *immunoblot* contra MnSOD. Con esto detectamos sólo los niveles de MnSOD nitrada, por lo que, podremos determinar si la CIH induce nitración de la MnSOD en las células de la médula adrenal.

Encontramos que en las médulas adrenales de ratas que fueron sometidas a CIH, existe un aumento en los niveles de MnSOD nitrada y que el tratamiento con ácido ascórbico previene este aumento (Fig. 17A). Después, realizamos el control inverso en el cual inmunoprecipitamos la MnSOD con un anticuerpo específico contra la proteína que estaba acoplado a micro-esferas unidas a proteína A, y realizamos un *Western blot* contra 3-NT. Dicho control confirmó el aumento de MnSOD nitrada en las células de la médula

adrenal de ratas sometidas a CIH, y que el tratamiento con ácido ascórbico durante la exposición a CIH logró prevenir el incremento de MnSOD nitrada (Fig. 17B).

Estos resultados proponen a la nitración de la MnSOD como la causa de la caída de la actividad de esta enzima inducida por CIH en células cromafines de la médula adrenal.

Luego, realizamos una estrategia experimental similar pero usando homogenizados de CBs de rata en la cual inmunoprecipitamos todas las proteínas nitradas y realizamos el *Western blot* contra MnSOD. Encontramos que la CIH produce aumento de los niveles de MnSOD nitrada, y que este aumento es revertido cuando administramos ácido ascórbico a las ratas (Fig. 18A). El control inverso en donde co-inmunoprecipitamos la MnSOD y detectamos los niveles de 3-NT por *immunoblot* en CBs, confirmó los datos encontrados anteriormente, en los que la CIH aumenta los niveles de MnSOD nitrada y que este aumento es prevenido con el tratamiento con ácido ascórbico (Fig. 18B).

En resumen, pese a que en los CBs de ratas expuestas a CIH también encontramos nitración de la MnSOD, la actividad de la MnSOD en estos animales está aumentada. Por lo que, al unir los datos de actividad, co-inmunoprecipitación y expresión, es posible atribuir el aumento de actividad de MnSOD en los CBs de ratas sometidas a CIH al aumento en los niveles de proteína de la MnSOD, aumento que no es observado en las médulas adrenales, en donde sólo el efecto de la inactivación por nitración de la MnSOD está presente.

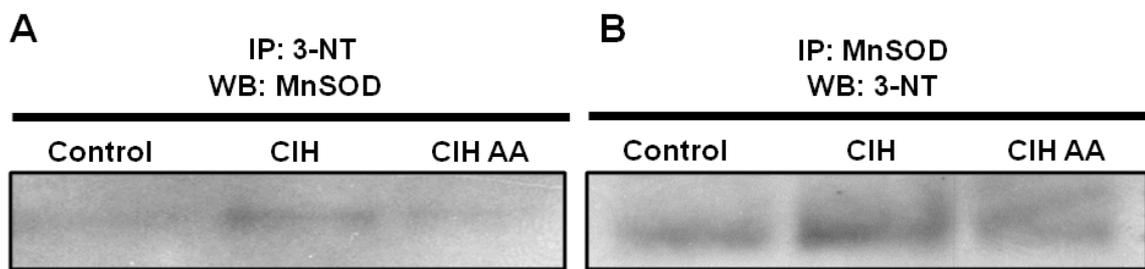


Figura 17. La CIH induce nitración de la MnSOD en médulas adrenales. A, En homogenizados de médulas adrenales de ratas control, sometidas a CIH o sometidas a CIH pero suministradas con ácido ascórbico (CIH AA), se inmunoprecipitaron las proteínas nitradas usando un anticuerpo contra 3-nitrotirosinas (IP: 3-NT) y luego, se realizó el *Western blot* contra MnSOD (WB: MnSOD). B, Se realizó el control inverso inmunoprecipitando la MnSOD (IP: MnSOD) y realizando el *Western blot* contra 3-NT (WB: 3-NT). Se usaron médulas adrenales de 5 ratas por carril.

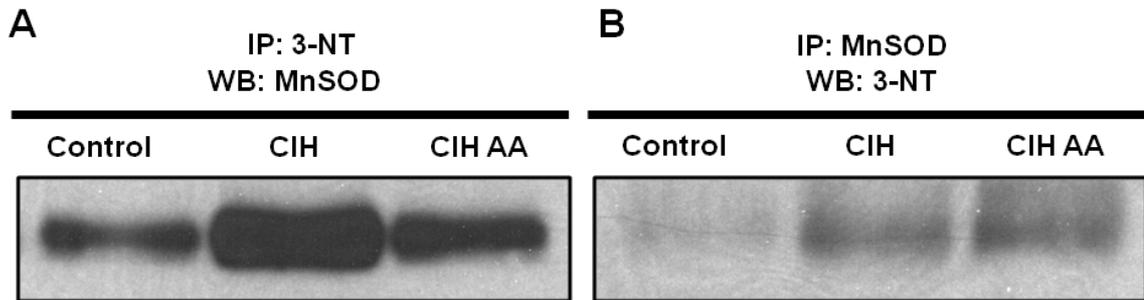


Figura 18. La CIH produce nitración de la MnSOD en CBs de ratas. A, En homogenizados de CBs de ratas sometidas a condiciones control, CIH, o CIH suministradas con ácido ascórbico (CIH AA) se inmunoprecipitaron todas las proteínas nitradas usando un anticuerpo contra 3-nitrotirosinas (IP: 3-NT) y luego realizó un *Western blot* contra MnSOD (WB: MnSOD) detectando así el aumento de los niveles de MnSOD nitrados. B, en el control inverso se inmunoprecipitó la MnSOD (IP: MnSOD) y luego se realizó el *Western blot* contra 3-NT (WB: 3-NT) confirma el aumento de MnSOD nitrada en CBs de ratas expuestas a CIH. En ambos casos el tratamiento con ácido ascórbico (CIH AA) previene el aumento de los niveles de MnSOD nitrada. Para cada banda se usaron 24 CBs extraídos de ratas que fueron sometidas a cada tratamiento.

4.4 Estudio del efecto de CIH sobre la descarga quimiosensorial del CB.

Para evaluar el efecto de los radicales libres sobre la potenciación quimiosensorial del CB en animales sometidos a CIH, decidimos registrar la frecuencia de los potenciales de acción quimiosensoriales del CB en respuesta a la hipoxia aguda, utilizando electrodos de platino. Usando esta estrategia experimental, estudiamos el efecto de los ROS mitocondriales y del radical ONOO^- sobre la actividad del nervio carotídeo, observando así, la contribución que tienen estos radicales libres sobre la potenciación quimiosensorial.

4.4.1 Curso temporal de la descarga quimiosensorial del CB.

Se aisló quirúrgicamente el nervio carotídeo y se posicionó sobre dos electrodos de platino que fueron cubiertos con aceite mineral para aislarlos eléctricamente. Utilizando un pre-amplificador y un amplificador obtuvimos el electroneurograma, que nos permite observar los potenciales de acción que pasan por el nervio carotídeo (Fig. 19A). Usando un discriminador y un contador establecimos la ventana por sobre la cual contaremos (en Hz) los potenciales de acción que corresponden a la actividad quimiosensorial (línea punteada en Fig. 19A). Además, para asegurar la correcta fijación de esta ventana eléctrica, realizamos el test de *Dejours* administrando a la rata 100% O_2 . Esta maniobra silenció completamente la actividad quimiosensorial del CB, asegurando que los potenciales de acción que estamos contando corresponden a la detección de los niveles de oxígeno por parte del CB (Fig. 19B) y no a ruido generado por la preparación.

Cuando medimos la f_x del nervio carotídeo observamos que en ratas expuestas a 7 días de CIH existe un aumento de la respuesta quimiosensorial frente a un estímulo hipóxico agudo (Fig. 20). Decidimos estudiar cómo era el curso temporal de las respuestas quimiosensoriales en animales sometidos a condiciones control, 3, 5 y 7 días de CIH en respuesta a distintos niveles de oxígeno, y encontramos que existe potenciación

quimiosensorial en las ratas sometidas a 5 días de CIH. Este aumento se mantiene luego de exponer a las ratas a 7 días de CIH (Fig. 21).

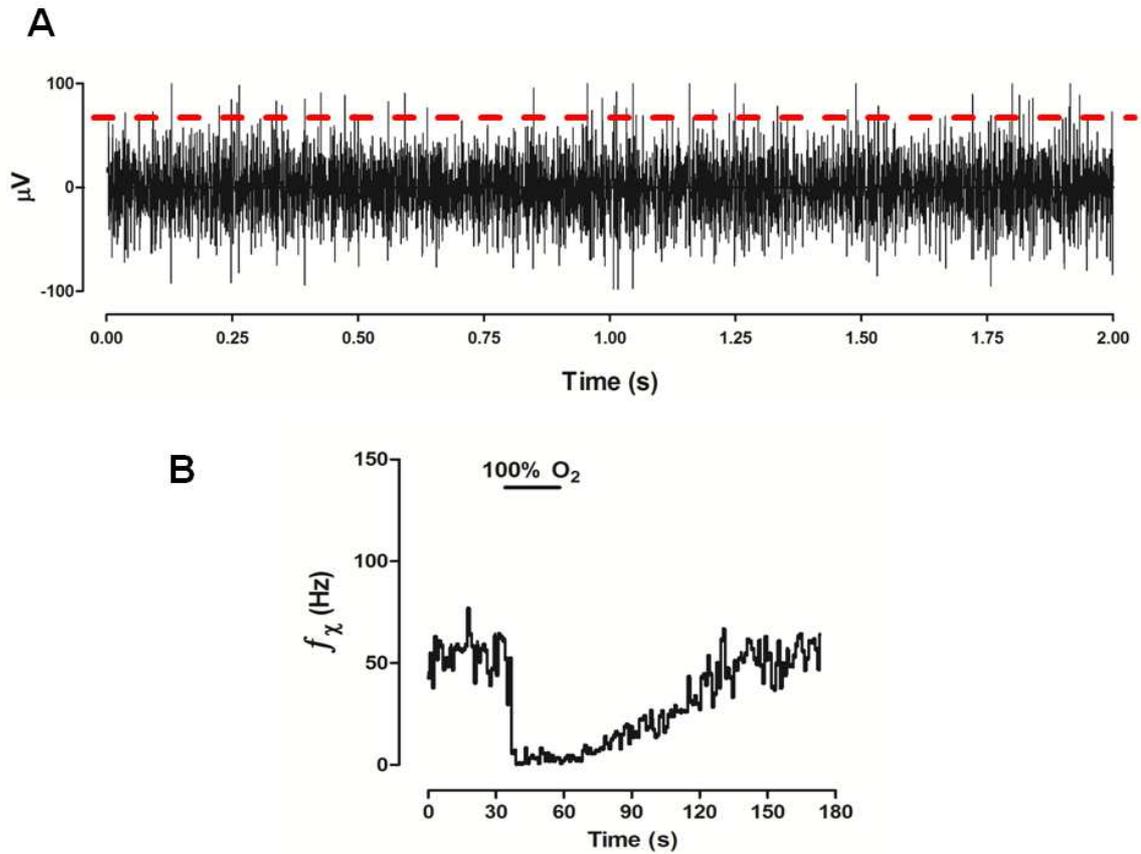


Figura 19. Registro de la actividad quimiosensorial del cuerpo carotídeo. Al aislar y colocar el nervio carotídeo sobre dos electrodos de platino es posible realizar el registro del electroneurograma de la actividad quimiosensorial (A). Además, el test de *Dejours*, que consiste en aplicar un estímulo hiperóxico de 100% de O₂ (B), nos permite corroborar que toda la actividad registrada (f_χ) corresponde a estímulos producidos por la detección de los niveles de oxígeno.

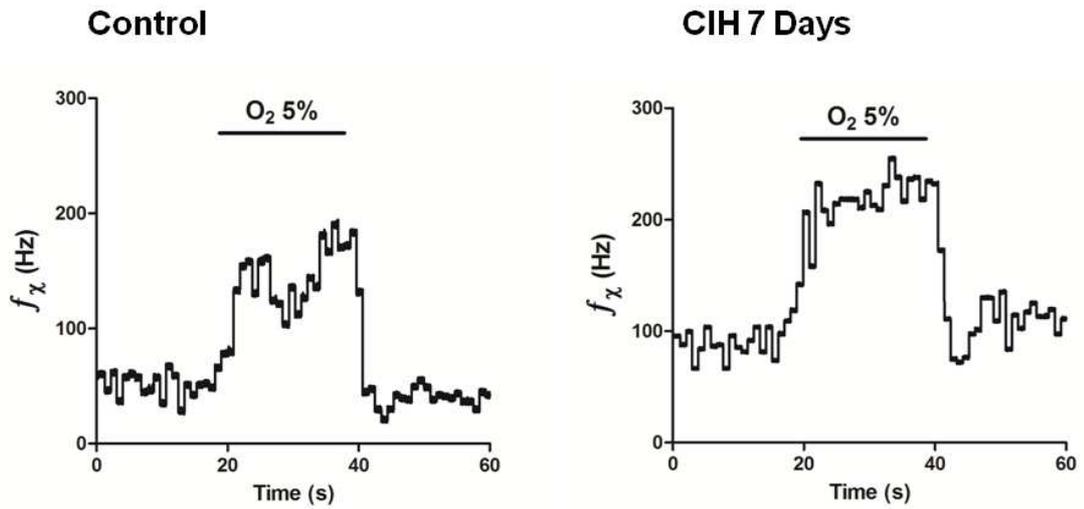


Figura 20. La exposición a CIH produce potenciación quimiosensorial del CB. El registro de la actividad quimiosensorial (f_x) del nervio carotídeo de una rata control y de una sometida a CIH, muestra que, frente a un mismo estímulo, la exposición a 7 días de CIH produce aumento de la descarga de potenciales de acción del nervio carotídeo denominada potenciación quimiosensorial.

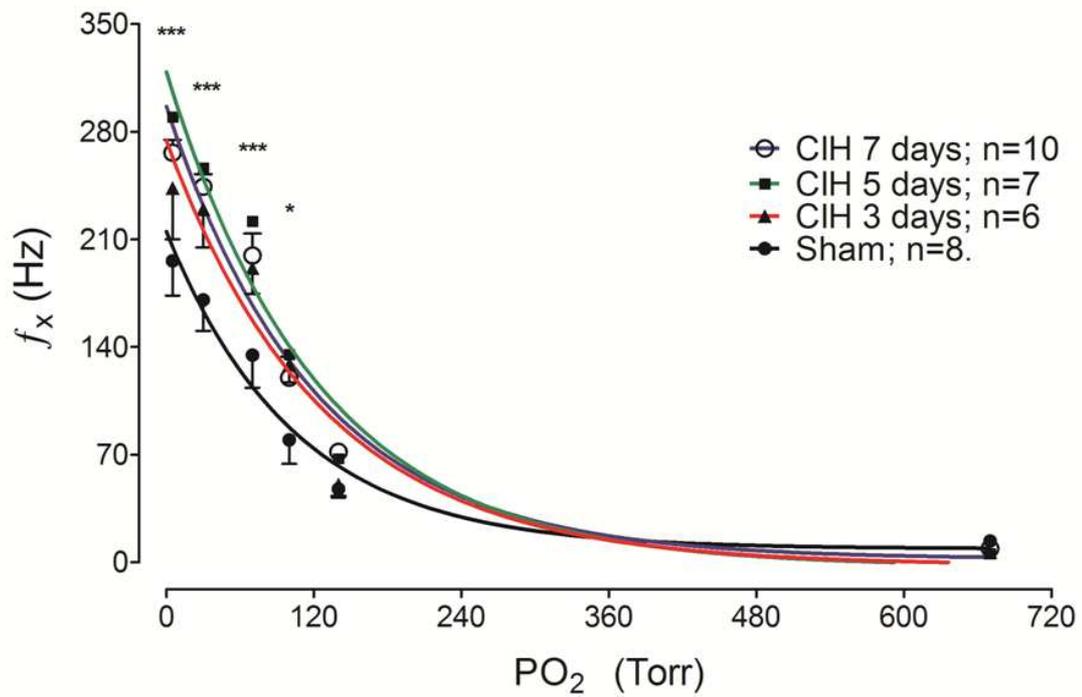


Figura 21. Curso temporal de la potenciación quimiosensorial medida en ratas sometidas a CIH. Frecuencia de descarga quimiosensorial (f_x) registrada desde el nervio carotídeo en respuesta a distintas presiones de oxígeno inspirado (5, 30, 70, 100, 130 y 670 Torr). Cada punto muestra la descarga máxima promedio durante 5 segundos en cada maniobra. Número de animales por grupo, indicado en la leyenda. Bonferroni luego de ANOVA de dos vías, * $P < 0,05$ y *** $P < 0,001$ sham vs. CIH 5 días.

4.4.2 Contribución de las ROS mitocondriales y del radical ONOO⁻ sobre la descarga quimiosensorial.

Existe controversia respecto al origen de las ROS involucradas en la potenciación quimiosensorial carotídea. Por lo que, para determinar si las ROS mitocondriales contribuyen a la potenciación quimiosensorial, decidimos administrar Mito-TEMPO (0,7 mg/Kg por día) a las ratas durante la exposición a CIH. Para esto, utilizamos bombas osmóticas subcutáneas, las que permiten la administración continua de la droga. Mito-TEMPO es un antioxidante que se acumula principalmente en la mitocondria, por lo que su administración nos permite evaluar si al atacar los ROS mitocondriales, se generan cambios en la potenciación quimiosensorial inducida por CIH. Encontramos que el tratamiento con Mito-TEMPO durante la exposición a CIH previene la potenciación quimiosensorial (Fig. 22A) y que las respuestas a diferentes niveles de O₂ son indistinguibles entre animales controles y aquellos animales sometidos a CIH pero que fueron tratados con Mito-TEMPO (Fig. 22B).

Luego, estudiamos la contribución del radical ONOO⁻ sobre la potenciación quimiosensorial. Dado que existe una correlación temporal entre el aumento de los niveles de 3-NT (Fig. 14) y la potenciación quimiosensorial en respuesta a la hipoxia (Fig. 21), decidimos evaluar la contribución del radical ONOO⁻ sobre la potenciación quimiosensorial. Para esto, usamos el antioxidante Ebselen (10 mg/Kg por día), que fue administrado a través de bombas osmóticas durante el tiempo en que se realizó el protocolo de CIH. Ebselen previno la potenciación quimiosensorial (Fig. 23A) y mantuvo las respuestas quimiosensoriales frente a diferentes presiones de O₂, en niveles similares a los observados en animales control (Fig. 23B). Estos resultados proponen que, tanto las ROS producidas en la mitocondria, como la

producción de radical ONOO^- , son fundamentales para generar la potenciación quimiosensorial del CB inducida por CIH.

El antioxidante Ebselen secuestra directamente los radicales ONOO^- , sin embargo, no asegura que produzca disminución de los niveles de 3-NT en las células del CB. Por esto, decidimos estudiar los niveles de 3-NT-ir en los CBs de animales que fueron sometidos a CIH pero que fueron suministrados con Ebselen o vehículo en bombas osmóticas subcutáneas. Los ensayos de inmunohistoquímica muestran un aumento de la 3-NT-ir en ratas sometidas a CIH cuando son comparadas con CBs de ratas control (Fig. 24A, B y D). Este aumento en la inmunorreactividad es prevenido cuando los animales fueron administrados con Ebselen durante la exposición a CIH (Fig. 24C y D).

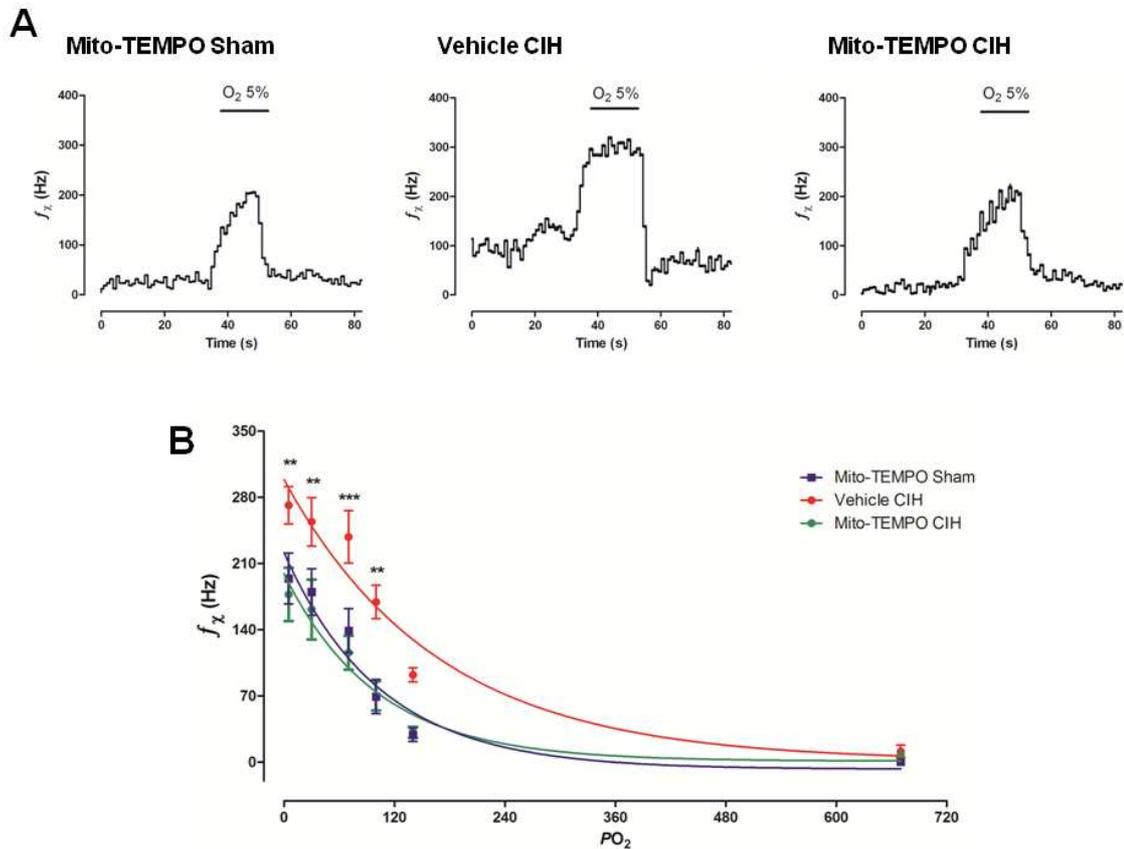


Figura 22. Las ROS mitocondriales son fundamentales para producir la potenciación quimiosensorial inducida por CIH. A, La administración del antioxidante Mito-TEMPO (dirigido específicamente a la mitocondria) previene la potenciación quimiosensorial del CB observada con estímulos hipóxicos de 5% O₂. B, la respuesta a distintos niveles de oxígeno en ratas tratadas con Mito-TEMPO pero que fueron sometidas a CIH, no es distinta a las observadas en ratas control (B). *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$ Bonferroni luego de ANOVA de dos vías, $n = 3-4$ ratas por grupo.

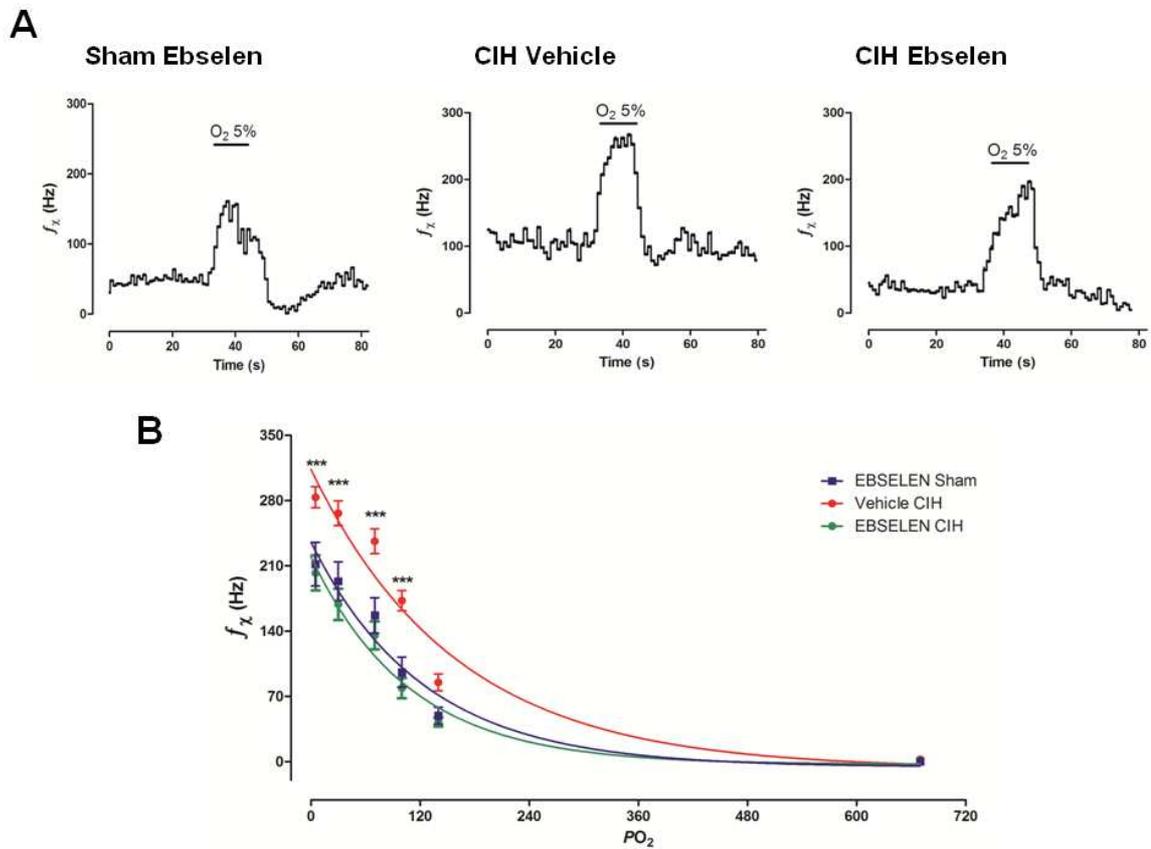


Figura 23. El radical ONOO^- es esencial para generar la potenciación quimiosensorial del CB inducida por CIH. A, ratas que fueron tratadas con Ebselen durante la exposición a CIH no presentan potenciación quimiosensorial. B, la respuesta a distintos niveles de hipoxia está potenciada en animales sometidos a CIH (línea roja en B). Sin embargo, al ser tratados con Ebselen no presentan aumento de las respuestas a la hipoxia aguda (B, líneas azul y verde). $n = 8$ ratas por grupo. Bonferroni luego de ANOVA de dos vías. *** $P < 0,001$.

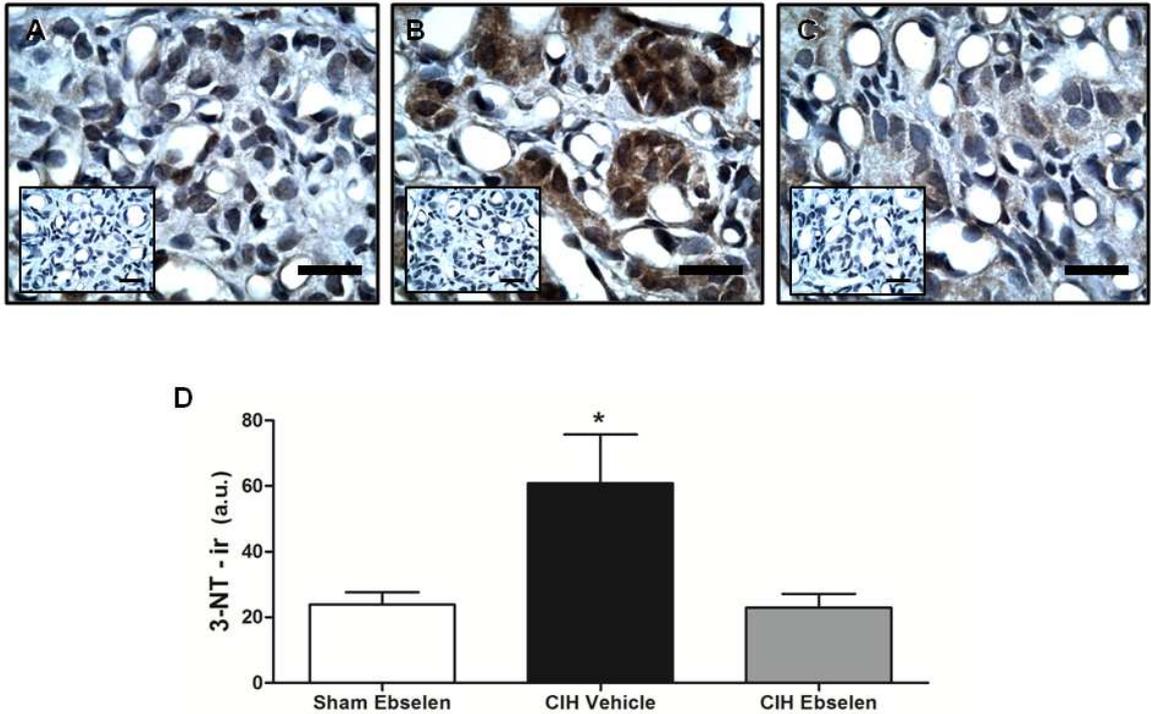


Figura 24. El tratamiento con Ebselen reduce los niveles de 3-NT en el CB. Las fotografías de cortes de CBs de una rata sometida a ciclos de aire:aire pero tratada con Ebselen (10 mg/Kg por día), una rata sometida a CIH administrada sólo con vehículo (B) o sometidas a CIH pero suministradas con Ebselen (C), muestran que el tratamiento con Ebselen previene el aumento de marca inmunorreactiva inducida por CIH. A-C barra 50 µm, inserto muestra el control negativo realizado sin agregar el anticuerpo primario. D, Cuantificación de la marca inmunorreactiva, Bonferroni luego de ANOVA de una vía, * $P < 0,05$ CIH Vehicle vs. sham Ebselen y CIH Ebselen, $n = 5$ ratas por grupo.

4.4.3 El tratamiento con Ebselen revierte la hipertensión inducida por CIH.

Observamos que la administración de Ebselen a ratas sometidas a CIH previene significativamente el aumento de los niveles de 3-NT en el CB, y que la dosis administrada de Ebselen tiene un efecto fisiológico que se traduce en impedir el aumento de la frecuencia de potenciales de acción del CB. Los estudios realizados en modelos animales han propuesto a la potenciación quimiosensorial como una de las primeras consecuencias patológicas en aparecer en respuesta a la CIH. Este aumento en la actividad quimiosensorial, desencadena el aumento de actividad del sistema nervioso simpático que produce el desarrollo de hipertensión inducido por CIH, tal como ocurre en pacientes con apnea obstructiva del sueño. Es por esto, que decidimos estudiar la presión arterial en animales sometidos a CIH utilizando transmisores telemétricos, que permiten registrar variables cardiovasculares en animales despiertos y con libre movimiento, sin la necesidad realizar las mediciones bajo los efectos de la anestesia.

En registros de presión arterial realizados en ratas observamos que luego de 7 días de exposición a CIH, se produce un aumento de la presión arterial (Fig. 25B) en comparación a la presión medida en el mismo animal pero antes de ser sometido a CIH (Fig. 25A). Una vez que la rata desarrolló la hipertensión inducida por CIH, decidimos implantar una bomba osmótica con Ebselen, de manera que esta vez el antioxidante esté siendo administrado como un tratamiento a la enfermedad desarrollada, y no con fines preventivos. El tratamiento con Ebselen por una semana redujo los niveles de presión arterial a valores similares a los observados antes del inicio del protocolo de CIH (Fig. 25C). Al cuantificar los parámetros cardiovasculares durante normoxia, encontramos que Ebselen revierte el aumento de la presión arterial media y el aumento de presión diastólica inducido por CIH

(Fig. 26A y D). La presión sistólica, la frecuencia cardíaca y la presión de pulso medidas en las ratas, no mostraron diferencias significativas al ser sometidas a CIH o al ser tratadas con Ebselen (Fig. 26B, C y E).

Por otra parte, decidimos estudiar si las respuestas de presión a la hipoxia aguda se ven modificadas por la exposición a CIH. Al colocar una rata en una cámara en donde por inyecciones de nitrógeno, se generó un estímulo hipóxico cercano al 5%, y observamos un aumento transitorio de la presión arterial (Fig. 27A). Sin embargo, cuando esta misma rata fue sometida a 7 días de CIH, la respuesta a un estímulo hipóxico similar está aumentada, y se genera un incremento mayor de la presión arterial inducida por hipoxia aguda (Fig. 27B). El tratamiento con Ebselen por 7 días restaura las respuestas presoras a niveles similares a los observados en el primer estímulo hipóxico (Fig. 27C). Al graficar las respuestas presoras a la hipoxia, expresadas como la diferencia entre la respuesta máxima registrada durante la hipoxia y la presión medida antes de la maniobra, encontramos que existe aumento de la respuesta presora a la hipoxia tanto en la presión arterial media (Fig. 28A), como en la presión sistólica (Fig. 28C), mientras que los otros parámetros cardiovasculares no mostraron diferencias significativas. El tratamiento con Ebselen revierte las respuestas presoras potenciadas a la hipoxia tanto en la presión arterial media como en la presión sistólica (Fig. 28).

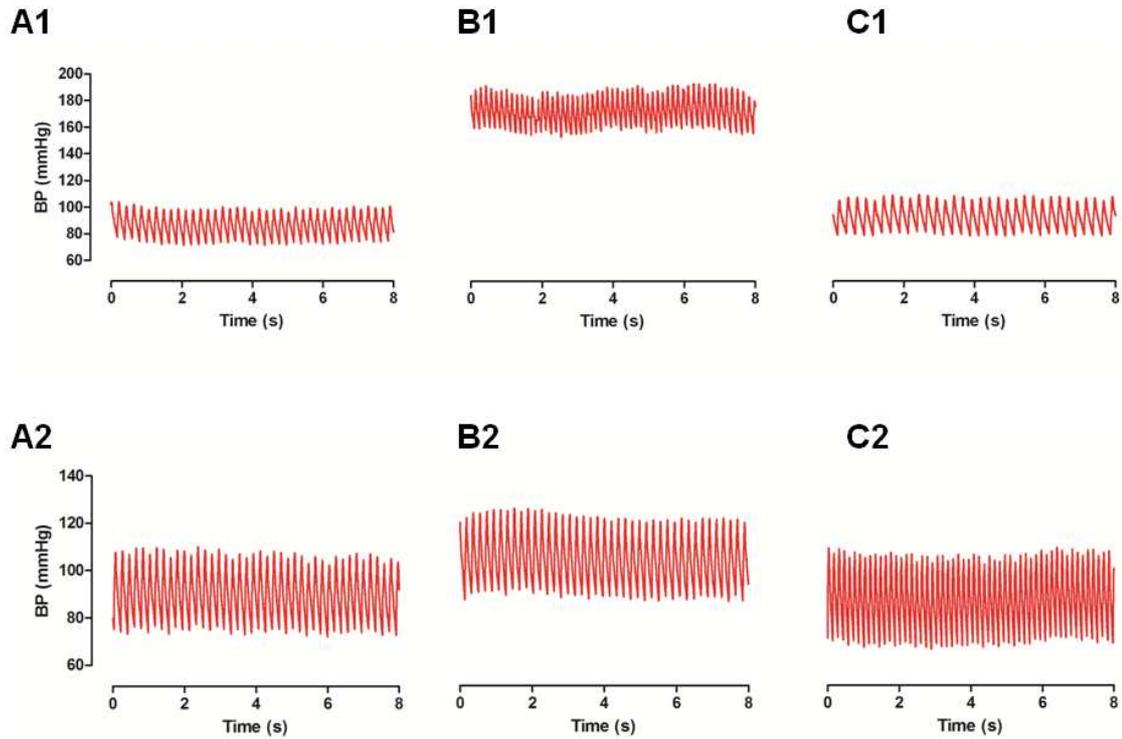


Figura 25. La CIH produce un aumento de presión arterial que es revertido al suministrar Ebselen. Registros telemétricos realizados en dos ratas (1 y 2) demuestran que, en comparación a condiciones control (A1, A2), cuando se someten a 7 días de CIH se genera un aumento de la presión arterial (B1, B2). Dicho aumento es revertido cuando los animales son tratados con Ebselen (10 mg/Kg por día) por una semana (C1, C2).

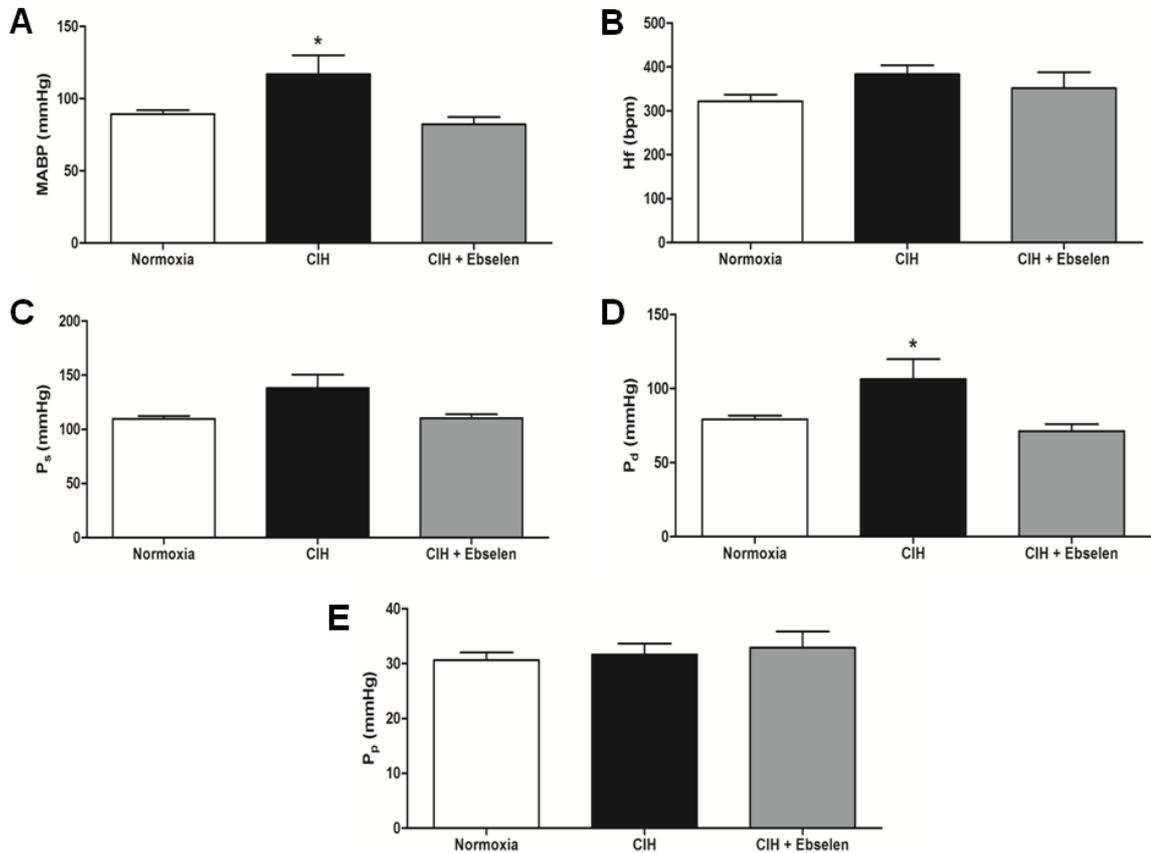


Figura 26. El tratamiento con Ebselen revierte la hipertensión inducida por CIH. Las mediciones realizadas con transmisores telemétricos muestran que el aumento en la presión arterial media (MABP, A), frecuencia cardíaca (Hf, B) presión sistólica (P_{sist} , C), presión diastólica (P_{diast} , D) y presión de pulso (P_{pulse} , E) inducidos por CIH en condiciones basales es revertida cuando los animales son tratados con Ebselen. Newman-Keuls luego de ANOVA de una vía de medidas repetidas, * $P < 0,05$ CIH vs. CIH Ebselen y Normoxia. $n = 4$ ratas.

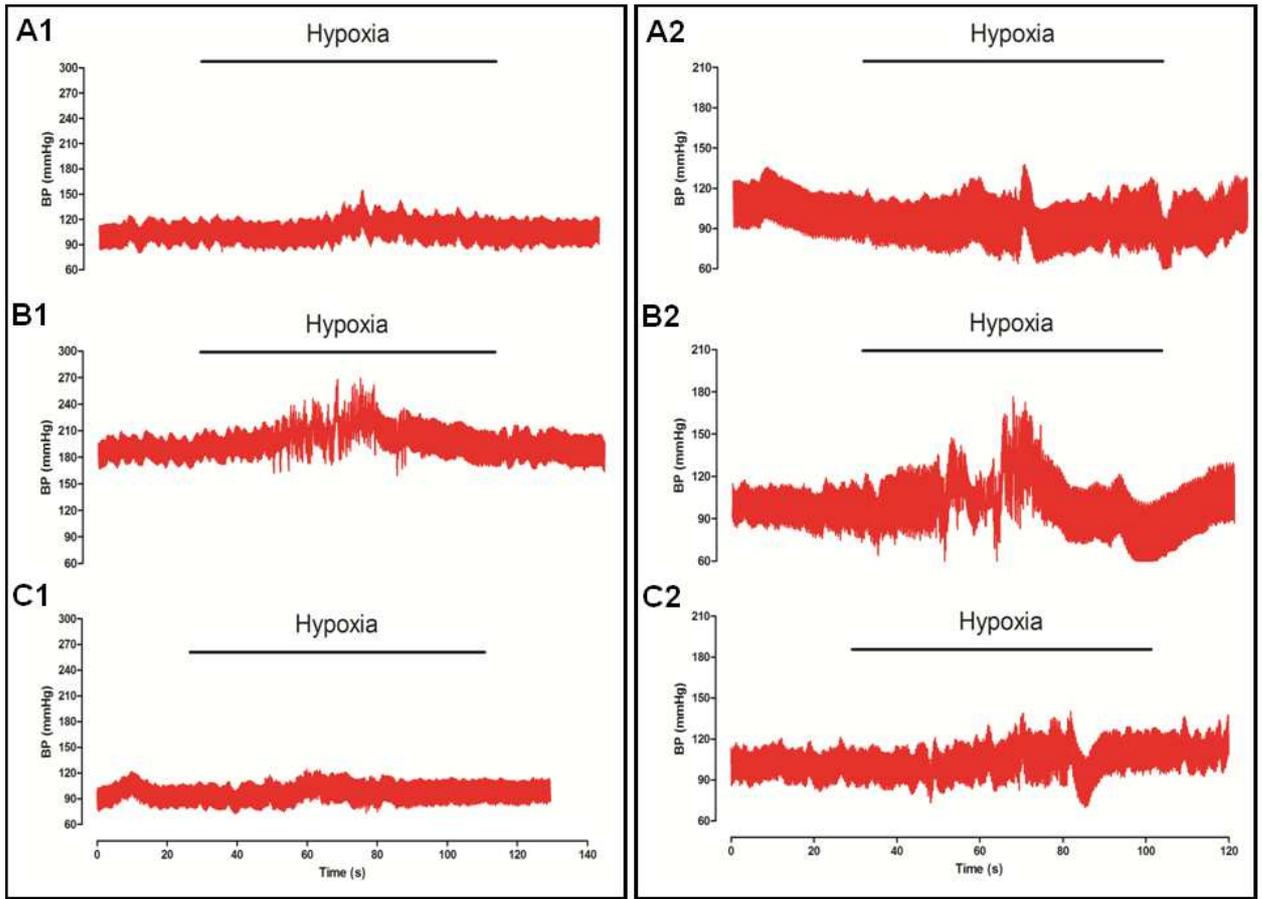


Figura 27. Las respuestas presoras inducidas por hipoxia aguda están aumentadas en animales sometidos a CIH, y dicho aumento es revertido al ser tratadas con Ebselen. Se muestra el registro de la presión arterial de dos ratas (1 y 2), medido desde la aorta abdominal mediante un transmisor telemétrico. Al someter a los animales a un estímulo hipóxico se genera un aumento de presión arterial (A1, A2). Luego de 7 días de CIH, esta respuesta está aumentada (B1, B2), sin embargo, el tratamiento con Ebselen por 7 días revierte el incremento en la presión arterial (C1, C2).

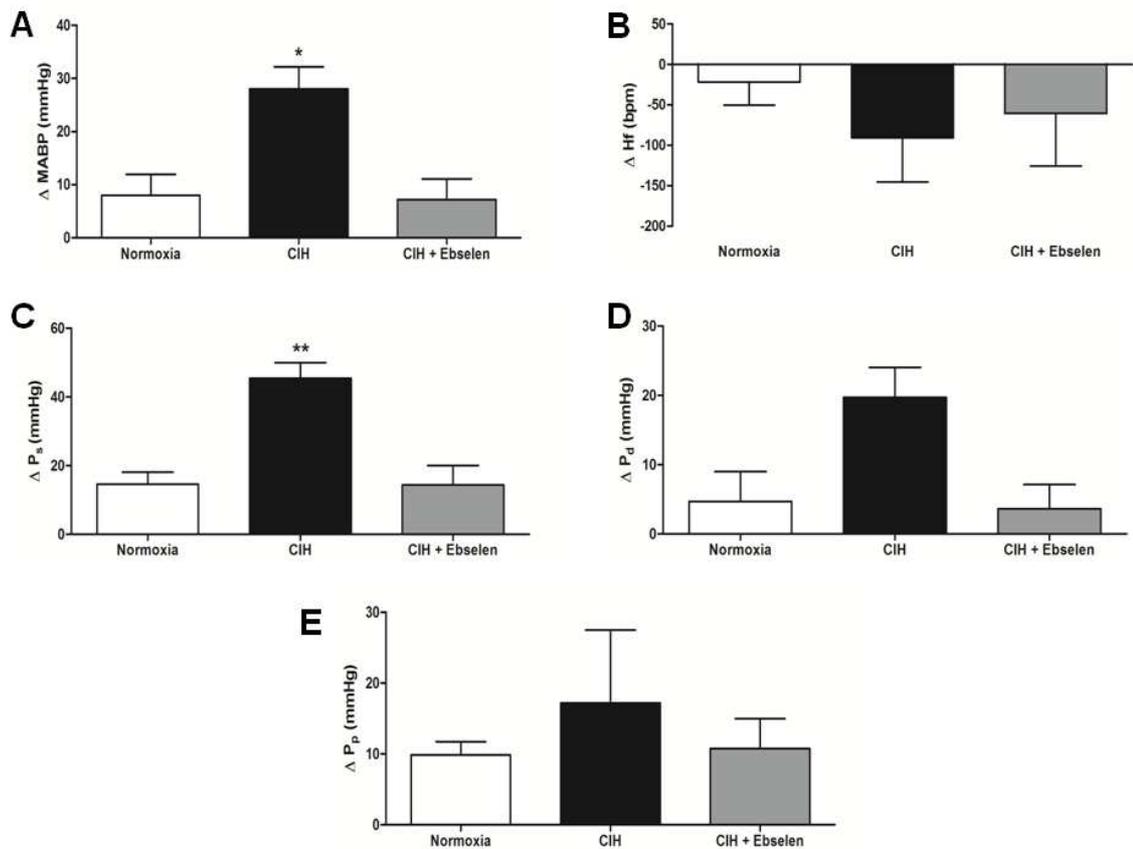


Figura 28. El incremento en la respuesta presora inducido por CIH es revertido cuando las ratas son suministradas con Ebselen. La CIH produce aumento de la presión arterial media (MABP, A), frecuencia cardíaca (Hf, B) presión sistólica (P_s , C), presión diastólica (P_d , D) y presión de pulso (P_p , E) inducidos por un estímulo hipóxico agudo. Y esta potenciación es revertida cuando los animales son tratados con Ebselen. Newman-Keuls luego de ANOVA de medidas repetidas, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ CIH vs. CIH Ebselen y Normoxia. $n = 4$ ratas.

5. DISCUSIÓN

Esta Tesis Doctoral describe que la CIH incrementa los niveles de MnSOD en el CB de rata, pero no en las médulas adrenales ni en el ganglio cervical superior. Este incremento es dependiente de ROS pues no ocurre en animales que fueron suministrados con el antioxidante ácido ascórbico durante el protocolo de CIH.

Encontramos que la exposición a CIH produce disminución de los niveles NO en CBs de rata.

La CIH aumenta los niveles de 3-NT en CBs y médulas adrenales de rata. En los CBs, el aumento de 3-NT se produce luego de 3 días de CIH, y se mantiene elevado en animales que fueron sometidos a CIH por 5 y 7 días.

Evaluamos la actividad de la MnSOD en homogenizados de médulas adrenales y CBs de ratas control, sometidas a CIH. En las células de la médula adrenal, la CIH reduce la actividad de MnSOD. Pero, en los CBs, la actividad de la MnSOD está aumentada en ratas sometidas a CIH comparada a la condición control.

Observamos que la CIH incrementa los niveles de MnSOD nitrada en homogenizados de médulas adrenales y de CBs, y esta nitración es prevenida en ambos tejidos cuando las ratas fueron suministradas con ácido ascórbico durante el protocolo de CIH.

La exposición a 5 y 7 días de CIH genera aumento de las respuestas quimiosensoriales a la hipoxia aguda. Al administrar MitoTEMPO, un antioxidante cuyos efectos van dirigidos específicamente a la mitocondria; o Ebselen, que secuestra específicamente al radical ONOO⁻, la potenciación quimiosensorial es totalmente prevenida.

Cuando medimos la presión arterial de ratas antes y después de ser sometida a 7 días de CIH, utilizando un transmisor telemétrico, encontramos un aumento de las variables cardiorespiratorias medidas durante normoxia. Pero además, observamos una potenciación del aumento de presión evocado por hipoxia aguda. En estos animales la administración de Ebselen después de 7 días de CIH logró revertir tanto el incremento en la presión observada en condiciones de normoxia, como las respuestas presoras evocadas por un estímulo hipóxico.

5.1 Actividad y expresión de MnSOD en las células glómicas del CB.

En esta tesis se midieron por primera vez los niveles de MnSOD en el CB de rata utilizando *Western blot*. El CB de la rata tiene un diámetro de sólo 400 µm (Pardal y cols. 2002), y tiene un peso aproximado de 25 µg (Yuan y cols. 2013), por lo que es difícil realizar ensayos de biología celular utilizando el CB de rata. Es por esto que algunos autores como el grupo de Prabhakar, han utilizado otros tipos celulares como modelo de las células glómicas del CB tomando en cuenta un origen embrionario común o similitudes tales como poseer la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis de catecolaminas (Nanduri y cols. 2009, Peng y cols. 2011, Nanduri y cols. 2012, Yuan y cols. 2013). Este grupo ha descrito que la CIH produce disminución de la actividad y de los niveles de la MnSOD en células PC12 (Nanduri y cols. 2009) y disminución de la actividad y los

niveles de esta enzima en células de la médula adrenal, y de los niveles del transcrito de RNA del gen de la MnSOD en CBs de rata (Nanduri y cols. 2012). Otros autores han estudiado la expresión de MnSOD en CBs usando un modelo de falla cardíaca crónica en conejos. En este modelo patológico, los conejos desarrollan un aumento de la actividad de los nervios simpáticos renales y un aumento de la actividad quimiosensorial del nervio carotídeo, tal como ocurre en los animales sometidos a CIH. El grupo de Ding y cols. (2010) encontró que los CBs de los conejos con falla cardíaca crónica presentan una caída en los niveles de la MnSOD.

Encontramos un aumento de los niveles de MnSOD en CBs de ratas que fueron sometidas a CIH (Fig. 6 y 7), mientras que los niveles de MnSOD en células de similares características, como las células de la médula adrenal (Fig. 5) o las neuronas del ganglio cervical superior, se mantuvieron inalterados luego de la exposición a CIH (Fig. 10 y 11). Estos resultados son inesperados, pues tomando como antecedente las mediciones de mRNA realizadas en CBs de rata por el grupo de Prabhakar, esperábamos encontrar reducidos los niveles de MnSOD en el CB. Este grupo ha descrito que la CIH produce disminución de la actividad y de los niveles de la MnSOD en células PC12 (Nanduri y cols. 2009); disminución de la actividad y los niveles de esta enzima en células de la médula adrenal; y de los niveles de transcrito del RNA del gen de la MnSOD en CBs de rata (Nanduri y cols. 2012). Sin embargo, otros trabajos han reportado incrementos en los niveles MnSOD en respuesta a la hipoxia, la que actuaría de manera compensatoria al aumento de los radicales libres. De hecho Chou y cols. (2009) usando un protocolo de hipoxia sostenida en ratas (10% O₂ por 15 horas diarias por 4 semanas), encontraron un aumento de los niveles de MnSOD, y no en los niveles de CuZnSOD. Además, estudiaron los niveles de mRNA de ambas proteínas pero no encontraron cambios, por lo que los cambios en los niveles de MnSOD son atribuidos a las modificaciones post-traduccionales.

De forma similar, Pardo y cols. (2008) encontraron que en el hígado de ratas sometidas a un modelo de hipoxia/reperfusión existía un aumento de los niveles y de la actividad de la MnSOD y no encontraron cambios en los niveles de CuZnSOD. Otros autores han descrito en cardiomiocitos, que la CIH otorga tolerancia al daño isquémico. Estos autores han propuesto que el mecanismo involucrado en este proceso implica el aumento de los niveles y de la actividad de MnSOD; y que este aumento es prevenido cuando las ratas son tratadas con el antioxidante *N*-acetilcisteína (Balková y cols. 2011). Estos resultados son similares a los que encontramos en esta Tesis Doctoral, en donde el tratamiento con ácido ascórbico previene el aumento de los niveles de MnSOD inducido por CIH (Fig. 8) y, en conjunto, apuntan a que las ROS participan en la regulación de los niveles de la MnSOD. Se ha reportado en CBs, que la MnSOD está bajo el control del factor de transcripción inducible por hipoxia 2 alfa (HIF-2 α) (Yuan y cols. 2013, Nanduri y cols. 2009) por lo que también es posible que el factor de transcripción HIF-2 α regule los niveles de MnSOD en el CB de ratas sometidas a CIH. Pese a que este argumento requiere un aumento de los niveles de mRNA del gen de la MnSOD, y hasta ahora los estudios publicados sólo muestran lo contrario en células del CB (Nanduri y cols. 2009 y 2011), un estudio reciente ha demostrado que la presencia de ROS estabiliza a HIF-2 α en un mecanismo que involucra la activación de la vía mTOR y la estabilización del complejo proteico mTOR 2 (mTORC2) por parte de las ROS (Nayak y cols. 2013). Este mecanismo explicaría que el tratamiento con antioxidantes prevenga el aumento de los niveles de MnSOD en el CB (Fig.8) tal como han encontrado otros autores (Balková y cols. 2011).

5.2 Producción de ROS en ratas sometidas a CIH.

Se ha propuesto que las ROS participan en la progresión de las enfermedades cardiovasculares y alteraciones cognitivas inducidas por OSA (Gozal & Kheirandish-Gozal, 2008; Lavie, 2003; Suzuki y cols. 2006). Estudios realizados en pacientes con OSA, y en animales expuestos a CIH muestran que los episodios de hipoxia/reoxigenación, propios de la exposición a la hipoxia intermitente, producen estrés oxidativo debido a la acumulación de las ROS (Lavie, 2003; Troncoso-Brindeiro y cols. 2007).

Por otra parte, el uso de antioxidantes miméticos de la SOD, han conferido especial importancia al radical O_2^- en el desarrollo de las consecuencias patológicas inducidas por CIH (Peng y cols. 2003; Troncoso-Brindeiro y cols. 2007). Se ha propuesto que la generación del radical O_2^- en células del CB de ratas sometidas a hipoxia intermitente tendría dos orígenes. Uno de ellos sería enzimático, pues se sabe que en animales sometidos a CIH existe un aumento de los niveles de transcrito y de la actividad de la NADPH oxidasa (Peng y cols. 2009); y el otro origen sería desde la mitocondria, ya que, se ha visto que la CIH produce disminución de la actividad del complejo I mitocondrial, lo que es consecuencia directa de un aumento en la generación de radicales libres por parte de la cadena transportadora de electrones (Peng y cols. 2003).

La administración del antioxidante dirigido a la mitocondria, Mito-TEMPO, previno la aparición de la potenciación quimiosensorial (Fig. 22). Estos resultados sugieren fuertemente que las ROS generadas desde la mitocondria contribuyen a la potenciación quimiosensorial. La dosis utilizada (10 mg/Kg) ha sido efectivamente usada antes por otros autores, en modelos de hipertensión inducida por administración de angiotensina II (Dilakova y cols. 2010) o por CIH (Khan y cols. 2011). Aunque es posible que algunos de los efectos del Mito-TEMPO no sean específicamente en la mitocondria, estos serían

minoritarios. La acumulación del Mito-TEMPO en la mitocondria se logra por su conjugación con el catión lipofílico trifenilfosfonio, lo que permite que el 90% del Mito-TEMPO administrado se encuentre en la mitocondria, dejando solo el 10% restante en el citoplasma (Dilakova y cols. 2010).

Estos resultados muestran que las ROS mitocondriales contribuyen al desarrollo de la potenciación quimiosensorial, pero no aclaran si este efecto es provocado directamente por las ROS mitocondriales o si éstas actúan como segundos mensajeros en una cascada de señalización. Es posible que el desbalance en la generación de ROS mitocondriales sea solo el primer efecto de una desestabilización mitocondrial, pero son necesarios mas experimentos (medición del potencial mitocondrial o evidencias de la formación del poro de permeabilidad mitocondrial transitorio) para definir esta interrogante.

El uso de miméticos de la SOD, o de otros antioxidantes como ácido ascórbico, confirman la contribución del radical O_2^- , o de los ROS generados a partir de él, sobre los cambios inducidos por CIH. Por esto, es posible que el radical O_2^- producido en las células del CB esté reaccionando rápidamente para generar otras especies reactivas. Muchos de los trabajos publicados reportan la importancia de las ROS sobre las consecuencias de la CIH, midiendo las consecuencias producidas a partir de las reacciones del O_2^- o sus derivados, tales como la generación de productos de oxidación de proteínas, la oxidación del DNA, la peroxidación de lípidos, y la generación de 3-NT (Pialoux y cols. 2009, Peng y cols. 2006, Del Río y cols. 2010 y 2011). La reacción del radical O_2^- con el NO para formar ONOO⁻ tiene una alto coeficiente de velocidad ($\sim 7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Valko y cols. 2007), que además es 3,5 veces mayor que la dismutación del O_2^- por la SOD (Dweik, 2005). Este valor explica como puede formarse peroxinitrito con dos especies radicalarias particularmente elusivas (Ferrer-Sueta & Radi, 2009). Pero incluso, la formación de ONOO⁻ puede disminuir la disponibilidad del NO como resultado de su reacción con el O_2^- (Estévez &

Jordán 2002; Beckman & Koppenol, 1996), contribuyendo al desarrollo de hipertensión (Alvarez y cols. 2008). Por esto no es de extrañar que en los CBs de ratas sometidas a CIH, existan niveles aumentados de 3-NT (Fig. 14) y que tengan reducidos los niveles de NO (Fig. 15).

5.3 Contribución del radical ONOO⁻ sobre la potenciación quimiosensorial y el desarrollo de hipertensión inducida por CIH.

Como se mencionó en la sección anterior, el uso de miméticos de la MnSOD ha demostrado la importancia que tiene el radical O₂⁻ sobre la potenciación quimiosensorial del CB y sobre el desarrollo de hipertensión asociado a CIH (Peng y cols. 2003; Troncoso-Brindeiro y cols. 2007). Pero, hasta la fecha, no existen trabajos que muestren el aporte que tienen otras especies reactivas en producir el aumento de la actividad del CB en respuesta a la hipoxia aguda, o a la hipertensión presente en modelos animales de apnea obstructiva del sueño. Existe evidencia que demuestra la participación del peroxinitrito en distintos tipos de enfermedades, tales como diabetes tipo 1, cáncer, derrame cerebral, falla cardíaca crónica, y enfermedades neurodegenerativas como Parkinson y Alzheimer (Pacher y cols. 2007, Szabó y cols. 2007). Sin embargo, esta Tesis Doctoral presenta evidencias experimentales de que el radical ONOO⁻ contribuye a la potenciación quimiosensorial (Fig. 23) y a la hipertensión inducida por CIH (Fig. 25 y 26) en un modelo animal de apnea obstructiva del sueño.

Se ha propuesto que la nitración de la MnSOD participa en muchas de las enfermedades que involucran la participación del radical ONOO⁻, incluyendo enfermedades renales, cardiovasculares y neurodegenerativas (Yamakura & Kawasaki, 2010). La nitración y la disminución de la actividad de la MnSOD por nitración en su tirosina 34, ha sido involucrada en el rechazo de aloinjertos de riñón en humanos, en un

mecanismo que incluye el aumento de los niveles de ROS por la caída de actividad de la MnSOD (Macillan-Crow y cols. 1996, 1997 y 2001). Además, se ha visto en un modelo animal de enfermedad de Alzheimer, que existe nitración de la MnSOD sin modificar sus niveles, esta nitración ha sido involucrada en la disfunción mitocondrial observada en la enfermedad de Alzheimer y explica la generación de estrés oxidativo en esta patología (Amantharaman y cols. 2006), pues resultados similares se han encontrado en cultivos primarios de neuronas extraídas desde ratones mutantes para presenilina 1 (Sompól y cols. 2008). Además se ha visto que existe nitración de la MnSOD pulmonar y una caída en su actividad en el daño pulmonar agudo presente en un modelo de isquemia/reperfusión hepático (Gray y cols. 2004).

Dada la importancia del balance del estrés oxidativo, los antecedentes antes expuestos nos llevaron a plantear que la nitración de la MnSOD y la caída de su actividad son relevantes para explicar la potenciación quimiosensorial del CB en ratas sometidas a CIH. Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación observamos que la MnSOD está nitrada en células de la médula adrenal y en las células del CB en ratas sometidas a CIH (Fig. 17 y 18). Cuando observamos la actividad de la MnSOD de ratas sometidas a CIH en estos dos tejidos, encontramos que sólo se encuentra disminuida en homogenizados de médulas adrenales (Fig. 15), y que, por el contrario, en homogenizados de CBs la exposición a CIH aumenta su actividad (Fig. 16). Esto es atribuible al hecho de que en las células de la médula adrenal no existen cambios de los niveles de MnSOD (Fig. 5), por lo que sólo está presente el efecto de la nitración. Sin embargo en las células del CB de ratas sometidas a CIH encontramos un incremento en los niveles de MnSOD (Fig. 6 y 7), lo que explicaría el aumento en la actividad de la MnSOD en estas ratas (Fig. 16) aunque sea modificada por nitración.

Ya que el tratamiento con Ebselen (antioxidante específico contra ONOO⁻) previene la potenciación quimiosensorial del CB, estudiamos si la administración de Ebselen revierte el aumento significativo de la presión arterial observado en ratas que fueron sometidas a CIH. Encontramos que el suministro de Ebselen revierte de manera eficaz el aumento de la presión arterial inducido por CIH. Más aún, en las ratas sometidas a CIH el aumento de presión en respuesta a la hipoxia aguda está potenciado, y Ebselen revierte esta potenciación en las respuestas presoras a la hipoxia aguda. Este estudio abre la posibilidad de que antioxidantes con afinidad al ONOO⁻ sean propuestos con usos terapéuticos contra la hipertensión inducida por CIH, tal como ha sido propuesto para otras patologías (Szabó y cols. 2007).

Se ha propuesto que el estrés oxidativo, la inflamación y el aumento del tono simpático inducidos por la CIH contribuyen a producir disfunción endotelial e hipertensión (Dempsey y cols. 2010; Garvey y cols. 2009; Iturriaga y cols. 2009; Lavie, 2003; Somers y cols. 2008). La potenciación quimiosensorial carotídea produce aumento del tono simpático, contribuyendo a la hipertensión inducida por CIH. La inactivación química del sistema nervioso simpático con 6-hydroxidopamina (Fletcher y cols. 1992b), y además la denervación renal o la extirpación de la médula adrenal (Bao y cols. 1997), previenen el aumento de presión arterial inducida por CIH. Se ha propuesto que la estimulación del sistema nervioso simpático activa al sistema renina-angiotensina, y sería fundamental para inducir el aumento de presión arterial producido por CIH. La exposición de ratas a CIH, produce aumento de la actividad de la renina plasmática (Fletcher y cols. 2001), y se ha visto que el tratamiento con Losartan, previene no sólo la hipertensión inducida por CIH (Fletcher y cols. 2001; Fletcher y cols. 1999), sino también, el aumento de la actividad del sistema nervioso simpático en respuesta a una apnea inducida (Marcus y cols. 2010), y la disminución de la vasodilatación inducida por acetilcolina en la arteria gracilis luego de 28

días de CIH (Marcus y cols. 2012). Más aún, se ha observado que la administración intracerebroventricular de Losartan previene la hipertensión inducida por CIH y el aumento de inmunorreactividad contra el factor FosB/ Δ FosB (como medida de la actividad neuronal) en zonas relacionadas a la activación del sistema nervioso simpático por CIH, tales como, el núcleo paraventricular del hipotálamo, la médula ventrolateral rostral, el órgano vascular de la lámina terminal, el núcleo preóptico medio y el núcleo del tracto solitario (Knight y cols. 2013). Otro trabajo demuestra que la infusión local de diferentes antagonistas de angiotensina (A-779 contra angiotensina 1-7; losartan y ZD7155 contra el receptor de angiotensina 1; y PD123319 contra el receptor de angiotensina 2) en el núcleo paraventricular, previene el aumento de presión arterial inducido por CIH (da Silva y cols. 2011).

Dado que, en los experimentos realizados en este trabajo, Ebselen es liberado por las bombas osmóticas al torrente sanguíneo y por lo tanto tiene efectos sistémicos, es posible que la droga actúe a nivel del sistema nervioso central, a nivel renal o en las arterias periféricas. Por lo tanto, no se puede descartar un efecto a nivel del sistema nervioso simpático y a nivel de la activación del sistema renina-angiotensina.

5.4 Posible rol de la S-nitrosilación de proteínas en los cambios inducidos por CIH.

Los experimentos realizados en esta tesis no permiten descartar que otras especies reactivas de oxígeno diferentes al ONOO^- , tales como el N_2O_3 , u otro tipo de modificaciones post-traduccionales tales como la S-nitrosilación de proteínas (a partir de N_2O_3) contribuyan a los cambios inducidos por CIH. Por lo que experimentos realizados en el futuro podrían evaluar la contribución de la S-nitrosilación sobre las consecuencias de la CIH (Fig. 29). Hasta la fecha no existen estudios que muestren la presencia o efectos de la

S-nitrosilación en el CB. Sin embargo, en neuronas de la zona CA1 del hipocampo de rata mediante registros de *patch clamp* se encontró que la CIH produce disminución de la actividad de los canales de K^+ de alta conductancia (o BK), la que es restaurada por dadores de NO; pero no cuando los dadores de NO fueron aplicados junto con el inhibidor de la nitrosilación N-etilmaleimida (Tjong y cols. 2008). Existe evidencia de que los canales de potasio BK se expresan en las células glómicas y que disminuyen su probabilidad de apertura durante la hipoxia, lo que favorecería la despolarización de la membrana y la liberación de neurotransmisores en respuesta a hipoxia (Lahiri y cols. 2006; Lopez-Barneo y cols. 1988). Por lo tanto, es posible que cambios en la actividad de los canales BK puedan modificar la excitabilidad de las células glómicas y del CB, favoreciendo la generación de la potenciación quimiosensorial luego de la exposición a CIH.

No se puede descartar que la nitrosilación de proteínas pueda alterar la actividad de otras proteínas que afecten la excitabilidad celular. Se ha visto, en preparaciones de corazón de perros, que el receptor de rianodina aumenta su actividad cuando es modificado post-traduccionalmente por nitrosilación. De hecho, dependiendo del número de S-nitrosotioles formados, pueden existir tres estados de activación en el canal del receptor de rianodina. De esta manera, la oxidación de cisteínas en el canal de Ca^{+2} receptor de rianodina puede facilitar su probabilidad de apertura y aumentar la salida de Ca^{+2} desde el retículo sarcoplásmico al citoplasma (Xu y cols. 1998). Y se ha propuesto en modelos de isquemia reperusión en músculo cardíaco de ratas, que la S-nitrosilación del canal de rianodina tipo 2 (RyR2), produce mayor salida de calcio comparado a ratas control (Fauconnier y cols. 2011, Donoso y cols. 2011). Por lo tanto, es posible que en el CB, la hipoxia intermitente, de manera similar que en la hipoxia/reperusión, cause S-nitrosilación del canal de rianodina en las células glómicas, aumentando su excitabilidad y

contribuyendo así a la potenciación quimiosensorial del CB, pero es necesario realizar los experimentos adecuados para contestar estas interrogantes.

5.5 Conclusiones.

Los resultados obtenidos en esta tesis, permiten obtener las siguientes conclusiones (Fig. 29):

El nivel de O_2^- producido en ratas sometidas a CIH es principalmente mitocondrial, y atribuible a las ROS generadas desde la fosforilación oxidativa.

El O_2^- producido reacciona con el NO formando $ONOO^-$, cuyos niveles están elevados en los CBs de ratas sometidas a CIH.

Uno de los principales productos de las reacciones del $ONOO^-$ es la nitración de proteínas, y la MnSOD es un blanco susceptible a ser nitrado. Sin embargo, en nuestro modelo, la nitración de la MnSOD no está involucrada en la generación de la potenciación quimiosensorial del CB.

El aumento de los niveles de $ONOO^-$ y la nitración de proteínas a partir de este radical, contribuyen a la potenciación quimiosensorial del CB y el desarrollo de hipertensión inducidos por CIH.

Es posible que el estudio de blancos moleculares de la nitración o el uso de antioxidantes que secuestren el radical $ONOO^-$ contribuyan a prevenir o atenuar las consecuencias patológicas inducidas por la CIH.

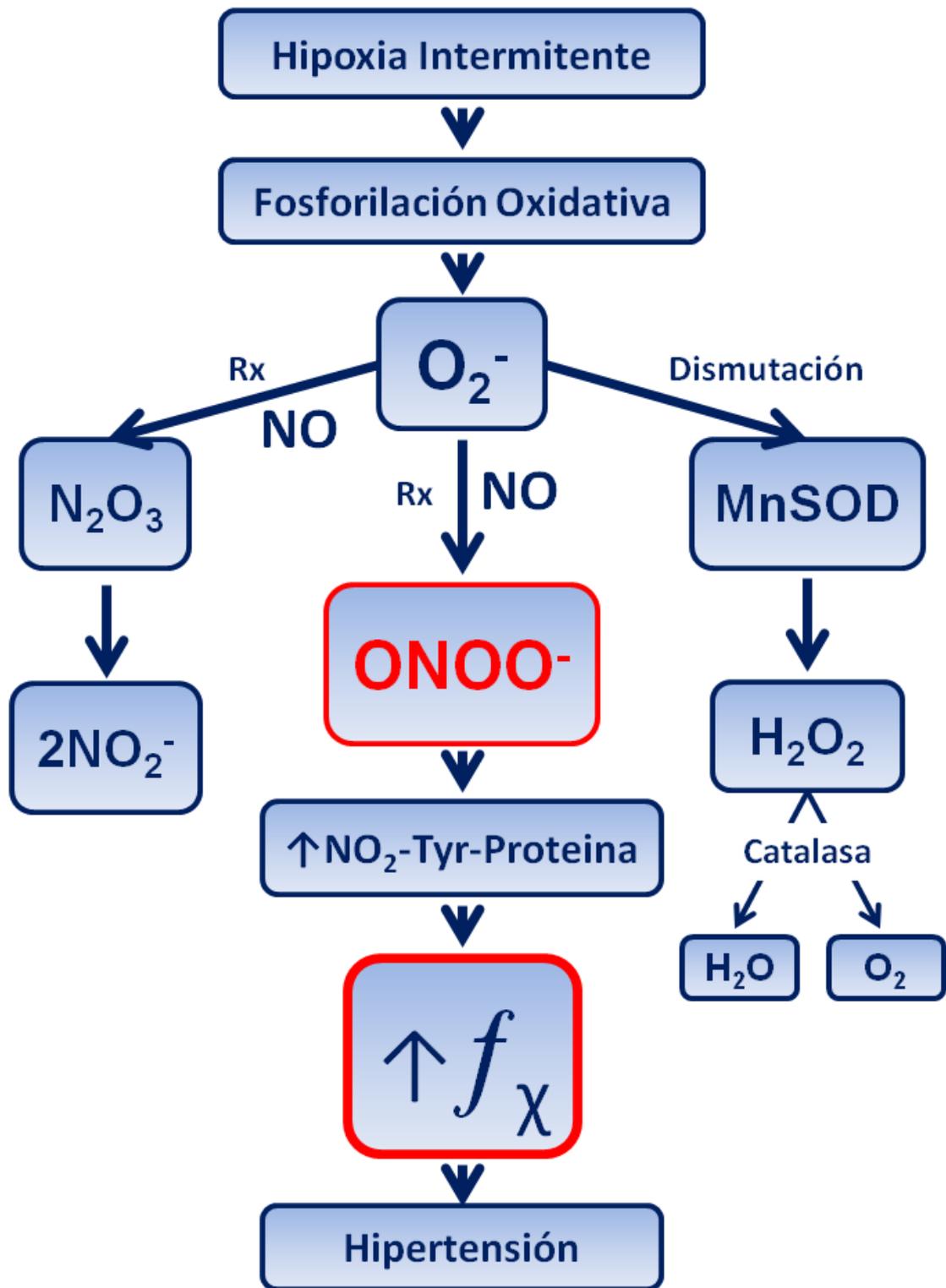


Figura 29. Mecanismo propuesto para el desarrollo de hipertensión y la generación de la potenciación quiosensorial del CB en ratas sometidas a CIH.

6. BIBLIOGRAFÍA

Alcayaga C, Varas R, Valdés V, Cerpa V, Arrollo J, Iturriaga R, Alcayaga J. ATP- and ACh- induced responses in isolated cat petrosal ganglion neurons. *Brain Res* 1131: 60-67, 2007.

Alvarez B, Demicheli V, Durán R, Trujillo M, Cerveñansky C, Freeman BA, Radi R. Inactivation of human CuZn superoxide dismutase by peroxynitrite and formation of histidinyl radical. *Free Rad Biol Med* 37: 813-822, 2004.

Alvarez Y, Briones AM, Hernanz R, Pérez-Girón JV, Alonso MJ, Salaices M. Role of NADPH oxidase and iNOS in vasoconstrictor responses of vessels from hypertensive and normotensive rats. *Br J Pharmacol* 153: 926-935, 2008.

Anantharaman M, Tangpong J, Keller JN, Murphy MP, Markesbery WR, Kinningham KK, St Clair DK. Beta-amyloid mediated nitration of manganese superoxide dismutase: implication for oxidative stress in a APPNLH/NLH X PS-1P264L/P264L double knock-in mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 168: 1608-1618, 2006.

Baguet JP, Barone-Rochette G, Tamisier R, Levy P, Pépin JL. Mechanisms of cardiac dysfunction in obstructive sleep apnea. *Nat Rev Cardiol* 9: 679-688, 2012.

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

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-C1437, 1996.

Beebe DW, Gozal D. Obstructive sleep apnea and the prefrontal cortex: towards a comprehensive model linking nocturnal upper airway obstruction to daytime cognitive and behavioral deficits. *11*: 1-16, 2002.

Brown CG. Nitric Oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta* 1411: 351–369, 1999.

Brueckl C, Kaestle S, Kerem A, Habazettl H, Krombach F, Kuppe H, Kuebler WM. Hyperoxia-induced reactive oxygen species formation in pulmonary capillary endothelial cells in situ. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 453-463, 2006.

Cassina A, Radi R.. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys* 328: 309–316, 1996.

Chou TF, Ma MC, Tsai CP, Chen CF. Enhancement of superoxide dismutase activity in rat lungs after hypoxic precondition. *Chin j Physiol* 52: 376-383, 2009.

Cistulli PA, Sullivan CE. Pathology of sleep apnea. In: Sleep and Breathing. Saunders NA, Sullivan CE (Eds) New York: Marcel Decker, 405-48, 1994.

Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* 1763: 747-758, 2006.

da Silva AQ, Fontes MA, Kanagy NL. Chronic infusion of angiotensin receptor antagonists in the hypothalamic paraventricular nucleus prevents hypertension in a rat model of sleep apnea. *Brain Res* 1368: 231-238, 2011.

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

De Caro R, Macchi V, Sfriso MM, Porzionato A. Structural and neurochemical changes in the maturation of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol* 185: 9-19, 2013.

Del Rio R, Moya EA, Iturriaga R. Carotid body and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia: the oxidative link. *Eur Resp J* 36:1-8, 2010.

Del Rio R, Moya EA, Iturriaga R. Differential expression of pro-inflammatory cytokines, endothelin-1 and nitric oxide synthases in the rat carotid body exposed to intermittent hypoxia. *Brain Res* 1395: 74-85, 2011.

Del Rio R, Moya EA, Parga MJ, Madrid C, Iturriaga R. Carotid body inflammation and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia. *Eur Resp J* 39: 1492-1500, 2012.

Del Rio R, Moya EA, Parga MJ, Madrid C, Iturriaga R. Carotid body inflammation and cardiorespiratory alterations in intermittent hipoxia. *Eur Resp J* 39: 1492-1500, 2012.

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* 301: L702-L711, 2011.

Demicheli V, Quijano C, Alvarez B, Radi R. Inactivation and nitration of human superoxide dismutase (SOD) by fluxes of nitric oxide and superoxide. *Free Radic Biol Med* 42: 1359-1368, 2007.

Dempsey JA, Veasey SC, Morgan BJ, O'Donnell CP. Pathophysiology of Sleep Apnea. *Physiol Rev* 90: 47-112, 2010.

Di Giulio C, Bianchi G, Cacchio M, Artese L, Rapino C, Macri MA, Di Ilio C. Carotid body HIF-1alpha, VEGF and NOS expression during aging and hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 147: 31-38, 2005.

Ding Y, Li YL, Zimmerman MC, Davisson RL, Schultz HD. Role of CuZn superoxide dismutase on carotid body function in heart failure rabbits. *Cardiovasc Res* 81: 678-685, 2009.

Ding Y, Li YL, Zimmerman MC, Schultz HD. Elevated mitochondrial superoxide contributes to enhanced chemoreflex in heart failure rabbits. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R303-R311, 2010.

Donoso P, Sanchez G, Bull R, Hidalgo C. Modulation of cardiac ryanodine receptor activity by ROS and RNS. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16: 553-567, 2011.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47-95, 2002.

Dumitrascu R, Heitmann J, Seeger W, Weissmann N, Schulz R. Obstructive sleep apnea, oxidative stress and cardiovascular disease: lessons from animal studies. *Oxid Med Cell Longev* doi: 10.1155/2013/234631.

Dweik RA. Nitric oxide, hypoxia, and superoxide: the good, the bad, and the ugly! *Thorax* 60: 265-267, 2005.

Eckert DJ, Malhotra A. Pathophysiology of adult obstructive sleep apnea. 15: 144-153, 2008.

Estévez AG, Jordán J. Nitric oxide and superoxide, a deadly cocktail. *Ann N Y Acad Sci* 962: 207-211, 2002.

Eyzaguirre C, Zapata P. Perspectives in carotid body research. *J Appl Physiol* 57: 931-957, 1984.

Fauconnier J, Meli AC, Thireau J, Roberge S, Shan J, Sassi Y, Reiken SR, Rauzier JM, Marchand A, Chauvier D, Cassan C, Crozier C, Bideaux P, Lompré AM, Jacotot E, Marks AR, Lacampagne A. Ryanodine receptor leak mediated by caspase-8 activation leads to left ventricular injury after myocardial ischemia-reperfusion. *Proc Natl Sci U S A* 108: 13258-13263, 2011.

Fletcher EC, Bao G, Li R. Renin activity and blood pressure in response to chronic episodic hypoxia. *Hypertension* 34: 309-314, 1999.

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

Fletcher EC, Lesske J, Culman J, Miller CC, Unger T. Sympathetic denervation blocks blood pressure elevation in episodic hypoxia. *Hypertension* 20: 612-619, 1992b.

Fletcher EC. Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure. *J Appl Physiol* 90: 1600-1605, 2001.

Fung ML, Ye JS, Fung PC. Acute hypoxia elevates nitric oxide generation in rat carotid body in vitro. *Pflugers Arch* 442: 903-909, 2001.

Garvey JF, Taylor CT, McNicholas WT. Cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea syndrome: the role of intermittent hypoxia and inflammation. *Eur Resp J* 33: 1195-1205, 2009.

Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev* 74: 829-898, 1994.

González C, Rocher A, Zapata P. Arterial chemoreceptors: cellular and molecular mechanisms in the adaptive and homeostatic function of the carotid body. *Rev Neurol* 36:239-254, 2003.

González C, Sanz-Alyayate G, Agapito MT, Obeso A. Effects of reducing agents on glutathione metabolism and the function of carotid body chemoreception cells. *Biol Chem* 385: 265-274, 2004.

González C, Sanz-Alyayate G, Agapito MT, Obeso A. Effects of reducing agents on glutathione metabolism and the function of carotid body chemoreception cells. *Biol Chem* 385: 265-274, 2004.

Gozal D, Gozal E, Gozal YM, Torres JE. Nitric oxide synthase isoform and peripheral chemoreceptor stimulation in conscious rats. *Neuroreport* 7: 1145-1148, 1996.

Gozal D, Kheirandish-Gozal L. Cardiovascular morbidity in obstructive sleep apnea, oxidative stress, inflammation, and much more. *Am J Respir Crit Care Med* 177: 369-375, 2008.

Gray KD, MacMillan-Crow LA, Simovic MO, Stain SC, May AK. Pulmonary MnSOD is nitrated following hepatic ischemia-reperfusion. *Surg Infect* 5: 166-173, 2004.

Gunther MR, Peters JA, Sivaneri MK. Histidinyl radical formation in the self-peroxidation reaction of bovine copper-zinc superoxide dismutase. *J Biol Chem* 277: 9160-9166, 2002.

Haddad JJ. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 969-977, 2004.

Hancock JT, Desikan R, Neill SJ. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans* 29: 345-350, 2001.

He L, Chen J, Liu X, Dinger B, Fidone S. Enhanced nitric oxide-mediated chemoreceptor inhibition and altered cyclic GMP signaling in rat carotid body following chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L1463-L1468, 2007.

Iturriaga R, Alcayaga J, Neurotransmission in the rat carotid body: transmitters and modulators between glomus cells and petrosal ganglion nerve terminals. *Brain Res Brain Res Rev* 47: 46-53, 2004.

Iturriaga R, Mosqueira M, Villanueva S. Effects of nitric oxide gas on carotid body chemosensory response to hypoxia. *Brain Res* 855: 282-286, 2000a.

Iturriaga R, Moya EA, Del Rio R, Carotid body potentiation induced by intermittent hypoxia: Implications for cardiorespiratory alteration induced by sleep apnoea. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36: 1197-204, 2009.

Iturriaga R, Rey S, Del Río R. Cardiovascular and ventilatory acclimatization induced by chronic intermittent hypoxia: a role for the carotid body in the pathophysiology of sleep apnea. 38: 335-340, 2005.

Iturriaga R, Villanueva S, Mosqueira M. Dual effects of nitric oxide on cat carotid body chemoreception. *J Appl Physiol* 89: 1005-1012, 2000b.

Khan SA, Nanduri J, Yuan G, Kinsman B, Kumar GK, Joseph J, Kalyanaraman B, Prabhakar NR. NADPH oxidase 2 mediates intermittent hypoxia-induced mitochondrial

complex I inhibition: relevance to blood pressure changes in rats. *Antioxid Redox Signal* 14: 533-542, 2011.

Knight WD, Saxena A, Shell B, Nedungadi TP, Mifflin SW, Cunningham JT. Central losartan attenuates increases in arterial pressure and expression of FosB/ Δ FosB along the autonomic axis associated with chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 305: R1051-R1058, 2013.

Lahiri S, Roy A, Baby SM, Hoshi T, Semenza GL, Prabhakar NR. Oxygen sensing in the body. *Prog Biophys Mol Biol* 91: 249-286, 2005.

Lavie L. Obstructive sleep apnoea syndrome--an oxidative stress disorder. *Sleep Med Rev* 7: 35-51, 2003.

Lévy P, Pépin JL, Arnaud C, Tamsier R, Borel JC, Dematteis M, Godin-Ribuot D, Ribuot C. Intermittent hypoxia and sleep-disordered breathing: current concepts and perspectives. 32: 1082-1095, 2008.

Li YL, Zheng H, Ding Y, Schultz HD. Expression of neuronal nitric oxide synthase in rabbit carotid body glomus cells regulates large-conductance Ca²⁺-activated potassium currents. *J Neurophysiol* 103: 3027-3033, 2010.

Liu X, He L, Stensaas L, Dinger B, Fidone S. Adaptation to chronic hypoxia involves immune cell invasion and increased expression of inflammatory cytokines in rat carotid body. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296: L158-L166, 2009.

López-Barneo J, López-López JR, Ureña J, González C. Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* 241: 580-582, 1988.

Loredo JS, Clausen JL, Nelesen RA, Ancoli-Israel S, Ziegler MG, Dimsdale JE. Obstructive sleep apnea and hypertension: are peripheral chemoreceptors involved? *Med Hypotheses* 56: 17-19, 2001.

MacFarlane PM, Wilkerson JE, Lovett-Barr MR, Mitchell GS. Reactive oxygen species and respiratory plasticity following intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 164: 263-271, 2008.

MacMillan-Crow LA, Crow JP, Kerby JD, Beckman JS, Thompson JA. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11853-11858, 1996.

MacMillan-Crow LA, Crow JP, Thompson JA. Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues. *Biochemistry* 37: 1613-1622, 1998.

Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL, Ahki KM, Sanders PW, Thompson JA. Mitochondrial tyrosine nitration precedes chronic allograft nephropathy. *Free Rad Biol Med* 31: 1603-1608, 2001.

Marcus NJ, Li YL, Bird CE, Schultz HD, Morgan BJ. Chronic intermittent hypoxia augments chemoreflex control of sympathetic activity: role of the angiotensin II type 1 receptor. *Respir Physiol Neurobiol* 171: 36-45, 2010.

Marcus NJ, Philippi NR, Bird CE, Li YL, Schultz HD, Morgan BJ. Effect of AT1 receptor blockade on intermittent hypoxia-induced endothelial dysfunction. *Respir Physiol Neurobiol* 183: 67-74, 2012.

Marin JM, Carrizo SJ, Vicente E, Agusti AG. Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study. *365*: 1046-1053, 2005.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055, 1969.

McNicholas WT, Bonsignore MR. Sleep apnoea as an independent risk factor for cardiovascular disease: current evidence, basic mechanisms and research priorities. *29*: 156-178, 2007.

Miao L, St Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Rad Biol Med* 47: 344-356, 2009.

Moya EA, Alcayaga J, Iturriaga R. NO modulation of carotid body chemoreception in health and disease. *Respir Physiol Neurobiol* 184: 158-164, 2012.

Naëgelé B, Thouvard V, Pépin JL, Lévy P, Bonnet C, Perret JE, Pellat J, Feuerstein C. Deficits of cognitive executive functions in patients with sleep apnea syndrome. *18*: 43-52, 1995.

Nanduri J, Makarenko V, Reddy VD, Yuan G, Pawar A, Wang N, Khan SA, Zhang X, Kinsman B, Peng YJ, Kumar GK, Fox AP, Godley LA, Semenza GL, Prabhakar NR. Epigenetic regulation of hypoxic sensing disrupts cardiorespiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 2515-2520, 2012.

Nanduri J, Wang N, Yuan G, Khan SA, Souvannakitti D, Peng YJ, Kumar GK, Garcia JA, Prabhakar NR. Intermittent hypoxia degrades HIF-2 α via calpains resulting

in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 1199-1204, 2009.

Narkiewicz K, van de Borne PJ, Cooley RL, Dyken ME, Somers VK, Sympathetic activity in obese subjects with and without obstructive sleep apnea. *Circulation* 98: 772-776, 1998a.

Narkiewicz K, van de Borne PJ, Montano N, Dyken ME, Phillips BG, Somers VK, Contribution of tonic chemoreflex activation to sympathetic activity and blood pressure in patients with obstructive sleep apnea. *Circulation* 97: 943-945, 1998b.

Narkiewicz K, van de Borne PJ, Pesek CA, Dyken ME, Montano N, Somers VK, Selective potentiation of peripheral chemoreflex sensitivity in obstructive sleep apnea. *Circulation* 99: 1183-1189, 1999.

Nayak BK, Feliers D, Sudarshan S, Friedrichs WE, Day RT, New DD, Fitzgerald JP, Eid A, Denapoli T, Parekh DJ, Gorin Y, Block K. Stabilization of HIF-2 α through redox regulation of mTORC2 activation and initiation of mRNA translation. *Oncogene* 32: 3147-3155, 2013.

Nurse CA. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms at peripheral arterial chemoreceptors. *Exp Physiol* 95: 657-667, 2010.

Ortiz FC, Del Rio R, Ebensperger G, Reyes VR, Alcayaga J, Varas R, Iturriaga R. Inhibition of rat carotid body glomus cells TASK-like channels by acute hypoxia is enhanced by chronic intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 185: 600-607, 2013.

Ortiz FC, Del Rio R, Ebensperger G, Reyes VR, Alcayaga J, Varas R, Iturriaga R. Inhibition of rat carotid body glomus cells TASK-like channels by acute hypoxia is enhanced by chronic intermittent hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 185: 600-607, 2013.

Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87: 315-424, 2007.

Parati G, Lombardi C, Narkiewicz K. Sleep apnea: epidemiology, pathophysiology, and relation to cardiovascular risk. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293:R1671-1683, 2007.

Pardal R, Ortega-Sáenz P, Durán R, López-Barneo J. Glia-like stem Cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* 131:364-377, 2007.

Pardo M, Budick-Harmelin N, Tirosh B, Tirosh O. Antioxidant defense in hepatic ischemia-reperfusion injury is regulated by damage-associated molecular pattern signal molecules. *Free Rad Biol Med* 45: 1073-1083, 2008.

Paton JF, Sobotka PA, Fudim M, Engelman ZJ, Hart EC, McBryde FD, Abdala AP, Marina N, Gourine AV, Lobo M, Patel N, Burchell A, Ratcliffe L, Nightingale A. The carotid body as a therapeutic target for the treatment of sympathetically mediated diseases. *Hypertension* 61: 5-13, 2013.

Pawar A, Nanduri J, Yuan G, Khan SA, Wang N, Kumar GK, Prabhakar NR. Reactive oxygen species-dependent endothelin signaling is required for augmented hypoxic sensory response of the neonatal carotid body by intermittent hypoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296: R735-R742, 2009.

Pawar A, Peng YJ, Jacono FJ, Prabhakar NR. Comparative analysis of neonatal and adult rat carotid body responses to chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 104: 1287-1294, 2008.

Peng YJ, Nanduri J, Khan SA, Yuan G, Wang N, Kinsman B, Vaddi DR, Kumar GK, Garcia JA, Semenza GL, Prabhakar NR. Hypoxia-inducible factor 2 α (HIF-2 α) heterozygous-null mice exhibit exaggerated carotid body sensitivity to hypoxia, breathing instability, and hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 3065-3070, 2011.

Peng YJ, Nanduri J, Yuan G, Wang N, Deneris E, Pendyala S, Natarajan V, Kumar GK, Prabhakar NR. NADPH oxidase is required for the sensory plasticity of the carotid body by chronic intermittent hypoxia. *J Neurosci* 29: 4903-4910, 2009.

Peng YJ, Overholt JL, Kline D, Kumar GK, Prabhakar NR. Induction of sensory long term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 10073-10078, 2003.

Peng YJ, Prabhakar NR. Effects of two paradigms of chronic intermittent hypoxia on carotid body sensory activity. *J Appl Physiol* 96: 1236-1242, 2004.

Peng YJ, Prabhakar NR. Reactive oxygen species in the plasticity of respiratory behavior elicited by chronic intermittent hypoxia. *J Appl Physiol* 94: 2342-2349, 2003.

Peng YJ, Raghuraman G, Khan SA, Kumar GK, Prabhakar NR. Angiotensin II evokes sensory long-term facilitation of the carotid body via NADPH oxidase. *J Appl Physiol* 111: 964-970, 2011b.

Peng YJ, Yuan G, Ramakrishnan D, Sharma SD, Bosch-Marce M, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR. Heterozygous HIF-1 α deficiency impairs carotid body-mediated systemic responses and reactive oxygen species generation in mice exposed to intermittent hypoxia. *J Physiol* 577: 705-716, 2006.

Peng YJ, Nanduri J, Raghuraman G, Wang N, Kumar GK, Prabhakar NR. Role of Oxidative Stress Induced Endothelin Converting Enzyme Activity in the Alteration of Carotid Body Function by Chronic Intermittent Hypoxia. *Exp Physiol IN PRESS* 2013.

Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *342: 1378-1384*, 2000.

Perry JJ, Shin DS, Getzoff ED, Tainer JA. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim Biophys Acta 1804: 245-262*, 2010.

Pialoux V, Hanly PJ, Foster GE, Brugniaux JV, Beaudin AE, Hartmann SE, Pun M, Duggan CT, Poulin MJ. Effects of exposure to intermittent hypoxia on oxidative stress and acute hypoxic ventilatory response in humans. *Am J Respir Crit Care Med 180: 1002-1009*, 2009.

Prabhakar NR, Peng YJ, Jacono FJ, Kumar GK, Dick TE. Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes. *Clin Exp Pharmacol Physiol 32: 447-449*, 2005.

Punjabi NM, Caffo BS, Goodwin JL, Gottlieb DJ, Newman AB, O'Connor GT, Rapoport DM, Redline S, Resnick HE, Robbins JA, Shahar E, Unruh ML, Samet JM. Sleep-disordered breathing and mortality: a prospective cohort study. *PLoS Med, 6: e1000132*, 2009.

Rey S, Corthorn J, Chacón C, Iturriaga R. Expression and immunolocalization of endothelin peptides and its receptors, ETA and ETB, in the carotid body exposed to chronic intermittent hypoxia. *J Histochem Cytochem 55: 167-174*, 2007.

Rey S, Del Rio R, Alcayaga J, Iturriaga R. Chronic intermittent hypoxia enhances carotid chemosensory and ventilator responses to hypoxia. *J Physiol 560: 577-586*, 2004a.

Rey S, Del Rio R, Iturriaga R. Contribution of endothelin-1 to the enhanced carotid body chemosensory responses induced by chronic intermittent hypoxia. *Brain Res 1086: 152-159*, 2006.

Rey S, Iturriaga R. Endothelins and nitric oxide: vasoactive modulators of carotid body chemoreception. *Curr Neurovasc Res 1:465-463*, 2004b.

Roosen A, Schober A, Strelau J, Bottner M, Faulhaber J, Bendner G, McIlwrath SL, Seller H, Ehmke H, Lewin GR, Unsicker K. Lack of neurotrophin-4 causes selective structural and chemical deficits in sympathetic ganglia and their preganglionic innervation. *J Neurosci 21: 3073-3084*, 2001.

Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* 23: 291-299, 2001.

Semenza GL, Prabhakar NR. HIF-1-dependent respiratory, cardiovascular, and redox responses to chronic intermittent hypoxia. *Antioxid Redox Signal* 9:1391-1396, 2007.

Shahar E, Whitney CW, Redline S, Lee ET, Newman AB, Nieto FJ, O'Connor GT, Boland LL, Schwartz JE, Samet JM. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 19-25, 2001.

Somers VK, White DP, Amin R, Abraham WT, Costa F, Culebras A, Daniels S, Floras JS, Hunt CE, Olson LJ, Pickering TG, Russell R, Woo M, Young T. Sleep apnea and cardiovascular disease: An American Heart Association. In collaboration with the National Heart, Lung, and Blood Institute National Center on Sleep Disorders Research (National Institutes of Health). *J Am Coll Cardiol* 52: 686-717, 2008.

Sompol P, Ittarat W, Tangpong J, Chen Y, Doubinskaia I, Batinic-Haberle I, Abdul HM, Butterfield DA, St Clair DK. A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. *Neuroscience* 153: 120-130, 2008.

Suzuki YJ, Jain V, Park AM, Day RM. Oxidative stress and oxidant signaling in obstructive sleep apnea and associated cardiovascular diseases. *Free Rad Biol Med* 40: 1683-1692, 2006.

Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6: 662-680, 2007.

Teppema JL, Dahan A. The ventilator response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurements, and analysis. *Physiol Rev* 90: 675-574, 2010.

Teppema LJ, Dahan A. The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurements, and analysis. *Physiol Rev* 90: 675-754, 2010.

Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L1005-1028, 2000.

Tjong YW, Li M, Hung MW, Wang K, Fung ML. Nitric oxide deficit in chronic intermittent hypoxia impairs large conductance calcium-activated potassium channel activity in rat hippocampal neurons. *Free Rad Biol Med* 44: 547-557, 2008.

Troncoso-Brindeiro CM, Da Silva AQ, Allahdadi KJ, Youngblood V, Kanagy NL. Reactive oxygen species contribute to sleep-apnea induced hypertension in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H2971-2976, 2007.

Ureña J, López-López J, González C, López-Barneo J. Ion current in dispersed chemoreceptors cells of the mammalian carotid body. *J Gen Physiol* 93:979-999, 1989.

Valdes V, Mosqueira M, Rey S, Del Rio R, Iturriaga R, Inhibitory effects of NO on carotid body: contribution of neural and endothelial nitric oxide synthase isoforms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L57-68, 2003.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84, 2007.

Wang W, Fang H, Groom L, Cheng A, Zhang W, Liu J, Wang X, Li K, Han P, Zheng M, Yin J, Wang W, Mattson MP, Kao JP, Lakatta EG, Sheu SS, Ouyang K, Chen J, Dirksen RT, Cheng H. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 134: 279-290, 2008.

Wang Z-Z, Stensaas LJ, Bredt DS, Dinger B, Fidone J. Localization and actions of nitric oxide in the cat carotid body. *Neuroscience* 60: 275-286, 1994.

Ward JP. Oxygen sensors in context. *Biochim Biophys Acta* 1777: 1-14, 2008.

Williams A, Scharf SM. Obstructive sleep apnea, cardiovascular disease, and inflammation--is NF- κ B the key? *Sleep Breath* 11: 69-76, 2007.

Xu L, Eu JP, Meissner G, Starnler JS. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science* 279: 234-237, 1998.

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

Yamakura F, Taka H, Fujimura T, Murayama K. Inactivation of human manganese-superoxide dismutase by peroxynitrite is caused by exclusive nitration of tyrosine 34 to 3-nitrotyrosine. *J Biol Chem* 273: 14085-14089, 1998.

Ye JS, Tipoe GL, Fung PC, Fung ML, Augmentation of hypoxia-induced nitric oxide generation in the rat carotid body adapted to chronic hypoxia: an involvement of constitutive and inducible nitric oxide synthases. *Pflugers Arch* 444: 178-185, 2002.

Young T, Palta M, Dempsey J, Skatrud J, Weber S, Badr S. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *New Engl J Med* 328: 1230-1235, 1993.

Yuan G, Peng YJ, Reddy VD, Makarenko VV, Nanduri J, Khan SA, Garcia JA, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR. Mutual antagonism between hypoxia-inducible factors 1 α and 2 α regulates oxygen sensing and cardio-respiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: E1788-1796, 2013.