



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS MENCIÓN  
CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Participación de los canales TRPC-ORAI activados por STIM (STOC) en la  
hipertensión pulmonar inducida por hipoxia intermitente crónica

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

POR

Sebastián Andrés Castillo-Galán

Director de Tesis: Dr. Rodrigo Manuel Iturriaga Agüera

Co-tutor: Dr. Bernardo Javier Krause Leyton.

Abril, 2022

## **DEDICATORIA**

**A mi familia; María Inés Galán y Victor Hugo Castillo, Inés Torres, Aida Fariña, Toto, Pepo. A mis amigos, banda y a Renate Kurz (Q.E.P.D.).**

*Cuando miras largo tiempo a un abismo,  
el abismo también mira dentro de ti...*

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Pontificia Universidad Católica de Chile, en especial a la Vicerrectoría de Investigación, quienes, gracias a la beca VRI y al proyecto Puente 010-2022 VRI-PUC, los cuales me facilitaron fondos para poder realizar la tesis bajo un alero económico. También a los proyectos FONDECYT# 1211443 y 1181341 que financiaron los experimentos de esta tesis.

En especial agradezco el apoyo de mi tutor, el Dr. Rodrigo Iturriaga, quien creyó en mí y en mi proyecto, que es muy diferente a su línea de investigación. Gracias a él y su apoyo pude llevarlo cabo a pesar de todas las dificultades (estallido social y pandemia).

Agradezco también al Departamento de Fisiológica: a su secretaria Mónica Flores, quien se portó excelentemente, resolviendo problemas a la brevedad; a Fidel Flores, quien me apoyó con el cuidado y manejo animal. Christian Cornejo, quien siempre estaba de buen humor y dispuesto a solucionar cualquier problema administrativo. Al Dr. Carlos Vio, Carlos Céspedes, Dr. Rodrigo Del Rio, Dra. Loreto Véliz, Dra. Eugenia Morcelli. Para todos ustedes, muchas gracias, no saben cuánto aprecio ese trato humano que pocas veces se da.

Agradezco también a mi co-tutor Dr. Bernardo Krause por facilitarme sus dependencias para la realización de mi tesis. También a los ex miembros de su laboratorio, Dr. Fabián Vega, Estefanía Peñaloza, Cherie Hernández. Agradezco también a la Dra. Paola Casanello, quien facilitó sus instalaciones y equipos donde pude terminar mis experimentos.

Agradezco también a mi primer mentor, el Dr. Roberto Reyes, quien me sumergió en el mundo de la hipertensión pulmonar, con el cual sigo y seguiré colaborando activamente.

Agradezco a la comisión evaluadora Dr. Rodrigo Del Río, Dr. Jorge Jalil, Dra. Margarita Calvo y al Dr. Claudio Pérez.

Agradezco a mis compañeros de doctorado, Flavia Cifuentes, Charlotte Hill, Martina Gonzales, y a mi futuro colega Germán Arenas, que más que un compañero, es un amigo quien me brindó su apoyo en todo lo que abarca la palabra.

Agradezco también a Tamara Jiménez, quien me dio su apoyo emocional y me contuvo en los momentos más difíciles por los que pasé durante estos 4 años.

Agradezco en especial a Bárbara Riquelme, mi amiga, confidente y pilar fundamental para el correcto desarrollo de esta tesis. Desestabilizó y estabilizó, al mismo tiempo, mi salud emocional.

Agradezco a Aldo, Diego y Cristóbal Aragón, integrantes de nuestra banda “Forzaken”, quienes me apoyaron sacándome el estrés del doctorado en cada ensayo y junta.

## INDICE DE MATERIAS

<b>INDICE DE MATERIAS .....</b>	<b>5</b>
<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS .....</b>	<b>13</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>14</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>16</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>19</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>22</b>
1.1. Hipertensión pulmonar hipóxica: Definición y características generales.....	22
1.2. Apnea obstructiva del sueño e hipertensión pulmonar hipóxica. ....	23
1.3. HIF y ROS: Rol en la hipertensión pulmonar hipóxica.....	25
1.4. Papel del calcio intracelular en las células musculares lisas de las arterias pulmonares y en la hipertensión arterial pulmonar. ....	28
1.5. Canales TRPC-ORAI activados por STIM (STOC): Vasoconstricción pulmonar hipóxica, remodelamiento vascular pulmonar e hipertensión pulmonar. ....	29
1.6. HIF y ROS: Moduladores de la expresión y función de canales STOC.....	32
<b>Figura 2. Modelo propuesto del aumento de expresión de STOC.....</b>	<b>35</b>
<b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>36</b>
2.1 Hipótesis .....	36
2.2. Objetivo General:.....	36
Determinar si la disfunción vascular pulmonar inducida por exposición a hipoxia intermitente crónica, dependen de los STOC, si esta es independiente del estrés oxidativo.	36
2.3 Objetivos específicos: .....	36
<b>3. METODOLOGÍA .....</b>	<b>38</b>

3.1	Protocolos aprobados de cuidado animales y bioseguridad.....	38
3.2	Modelo animal y protocolos de hipoxia crónica intermitente. ....	38
3.3	Imágenes de resonancia magnética.....	39
3.4.	Medición de presión sistólica ventricular derecha.....	40
3.5.	Miografía de alambre.....	41
3.6.	Extracción de mRNA y qPCR. ....	41
3.7.	Western Blotting. ....	42
3.8.	Marcadores de estrés oxidativo.....	43
3.9.	Medición del remodelamiento vascular y de colágeno.....	44
3.10.	Superficie luminal vascular y densidad vascular. ....	45
3.11.	Inmunohistoquímica. ....	45
3.12.	Infusión de 2-APB. ....	46
3.13.	Infusión de Tempol.....	46
3.14.	Análisis Bioinformático.....	47
3.15.	Análisis estadísticos.....	48
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
4.1	Curso temporal de los efectos de CIH sobre la presión ventricular derecha, el remodelamiento vascular pulmonar, disfunción cardiopulmonar, y los niveles génicos y proteicos de STOC a nivel pulmonar.....	49
	.....	49
4.1.1	Efectos de la exposición a CIH sobre a ganancia de peso de los animales. ....	49
4.1.2	Efectos de la exposición a CIH sobre la presión sistólica ventricular derecha y la frecuencia cardiaca. ....	51
4.1.3	Efectos de la exposición a CIH en la función cardiaca.....	53
4.1.4	Efectos de CIH sobre la función vaso contráctil en arterias pulmonares aisladas..	56
4.1.5.	Remodelamiento vascular pulmonar en ratas expuestas a diferentes periodos de CIH.....	58
4.1.6.	Colágeno total pulmonar y colágeno perivascular en arterias de 150-300 $\mu\text{m}$ de diámetro. ....	61
4.1.7.	Densidad vascular y superficie luminal en pulmones de ratas expuestas a diferentes periodos de CIH. ....	64

4.1.8. La exposición a CIH induce un aumento progresivo en la inmunorreactividad a $\alpha$ -actina en arterias pulmonares de ratas. ....	66
4.1.9. Estrés oxidativo sistémico y pulmonar en ratas expuestas a diferentes periodos de CIH.....	68
4.1.10. Cambios de la expresión génica relativa de las subunidades formadoras de STOC a nivel pulmonar en ratas expuestas a diferentes periodos de CIH. ....	70
4.1.11. Niveles proteicos de las subunidades formadoras de STOC a nivel pulmonar en animales expuestos a 28 días de CIH.....	72
4.2. Determinar los efectos de la administración in vivo de 2-APB, un inhibidor de la unión STIM-ORAI, sobre la presión pulmonar, contractibilidad vascular y el remodelamiento vascular. ....	74
4.2.1. El tratamiento con 2-APB previene el aumento de la presión sistólica ventricular derecha en ratas expuestas a hipoxia crónica intermitente. ....	74
4.2.2. El tratamiento con 2-APB impide el desarrollo del remodelamiento vascular pulmonar en ratas expuestas a hipoxia crónica intermitente. ....	76
4.2.3. El tratamiento con 2-APB previene el aumento de la inmunorreactividad a $\alpha$ -actina inducida por CIH. ....	78
4.2.4. El tratamiento con 2-APB previene el aumento de células de PASMC Ki67-positivos inducido por CIH.....	80
4.2.5. El tratamiento con 2-APB previene la disminución de la superficie vascular luminal inducida por CIH. ....	82
4.2.6. El tratamiento con 2-APB no previene el aumento en los marcadores de estrés oxidativo inducidos por CIH.....	84
4.2.7. El tratamiento con 2-APB reduce el aumento en la expresión pulmonar génica relativa de TRPC 1,4 y 6 y aumenta ORAI 1. ....	85
4.2.8. Correlación de Pearson entre variables fisiológicas y expresión de STOC.....	87
4.3. Determinar los efectos de Tempol sobre la expresión de los STOC, contractibilidad vascular y el remodelamiento vascular en ratas expuestas a CIH. ....	89
4.3.1. Efecto de la infusión de Tempol sobre la función vaso contráctil en arterias pulmonares aisladas de animales expuestos a CIH.....	90
4.3.2. El tratamiento con TEMPOL atenúa el efecto de la CIH sobre el remodelamiento vascular pulmonar.....	92
4.3.4. El tratamiento con Tempol no induce cambios en los marcadores de estrés oxidativo a nivel pulmonar. ....	94

4.3.5. El tratamiento con Tempol reduce el aumento en la expresión pulmonar génica relativa de TRPC 1 y TRPC4.....	96
4.4. Determinar y comparar la expresión diferencial de moduladores conocidos de STOC en el pulmón de animales expuestos a hipoxia sostenida e intermitente, mediante herramientas bioinformáticas. ....	98
4.4.1. Expresión de datos de expresión genética diferencial asociada a modulación de STOC y procesos biológicos inducidos por hipoxia crónica intermitente y sostenida.....	98
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>103</b>
5.1. La exposición a CIH induce hipertensión pulmonar y aumenta la expresión pulmonar de los STOC.....	103
5.2 El tratamiento con 2-APB previene la hipertensión pulmonar inducida por CIH. ....	109
5.3 Determinar los efectos de Tempol, un mimético de la SOD, sobre la expresión de STOC a nivel pulmonar, la vasoconstricción pulmonar y remodelamiento vascular pulmonar...	115
5.4 Regulación diferencial de STOC y sus posibles moduladores en hipoxia sostenida e hipoxia intermitente crónica. ....	119
<b>6. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>121</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>124</b>

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de activación de STOC. ....	31
Figura 2. Modelo propuesto del aumento de expresión de STOC.....	35
Figura. 3. Efecto de la hipoxia intermitente crónica (CIH) sobre la ganancia de peso durante el experimento. ....	50
Figura. 4. Efecto de la hipoxia intermitente crónica (CIH) sobre la presión sistólica ventricular derecha y la frecuencia cardiaca en ratas. ....	52
Figura 5. Imágenes axiales y longitudinales de corazón en resonancia magnética. ....	54
Figura 6. Efecto de la exposición a CIH sobre la función cardiaca. ....	55
Figura 7. Función vasoconstrictora de arterias pulmonares pequeñas aisladas a concentraciones crecientes de KCl y ET-1. ....	57
Figura 8. Efecto de a CIH sobre el remodelamiento vascular en arterias pulmonares de 150-300 $\mu\text{m}$ de diámetro. ....	59
Figura 9. Efecto de a CIH sobre el remodelamiento vascular en arterias pulmonares de 300-800 $\mu\text{m}$ de diámetro. ....	60
Figura 10. Efecto de a CIH sobre el colágeno perivascular arterias pulmonares de 150-300 $\mu\text{m}$ de diámetro. ....	62

Figura 11. Efecto de la CIH sobre el colágeno total pulmonar.....	63
Figura 12. Efecto de a CIH sobre la densidad vascular y superficie luminal en pulmones de ratas.....	65
Figura 13. Efecto de a CIH sobre la inmunorreactividad a $\alpha$ -actina en arterias pulmonares de ratas.....	67
Figura 14. Estrés oxidativo sistémico y pulmonar producido por CIH. ....	69
Figura 15. Efecto de CIH sobre la expresión pulmonar génica relativa de las subunidades formadoras de STOC en ratas.....	71
Figura 16. Efecto de la exposición a 28 días de CIH sobre los niveles pulmonares proteicos de las subunidades formadoras de STOC.....	73
Figura 17. Efecto de la administración de 2-APB sobre la presión sistólica ventricular derecha y frecuencia cardiaca en ratas expuestas a CIH.....	75
Figura 18. Efecto de la administración de 2-APB sobre el remodelamiento vascular pulmonar inducido por la exposición a CIH. ....	77
Figura 19. Efecto del 2-APB sobre la inmunorreactividad a $\alpha$ -actina en arterias pulmonares de ratas.....	79
Figura 20. Efecto del 2-APB sobre la inmunorreactividad a Ki-67 en miocitos vasculares pulmonares de ratas expuestas a CIH. ....	81
Figura 21. Efecto del 2-APB sobre la densidad vascular y superficie luminal en pulmones de ratas sometidas a CIH. ....	83

Figura 22. Efecto de la administración de 2-APB sobre la concentración de MDA pulmonar y sistémica.....	84
Figura 23. Efecto de la administración de 2-APB sobre la expresión génica relativa de STOC en ratas expuestas a CIH.....	86
Figura 24. Correlación de Pearson de variables fisiológicas en relación a la presión sistólica del ventrículo derecho.....	88
Figura 25. Efecto del Tempol en la función vasocontráctil a KCl y ET-1 en arterias pulmonares aisladas. ....	91
Figura 26. Efecto de la administración de Tempol sobre el remodelamiento vascular pulmonar inducido por la exposición a CIH. ....	93
Figura 27. Efecto de la administración de Tempol sobre los marcadores de estrés oxidativo. ....	95
Figura 28. Efecto de Tempol sobre la expresión pulmonar génica relativa de las subunidades formadoras de STOC. ....	97
Figura 29. Análisis de los procesos biológicos enriquecidos en genes involucrados en la modulación de STOC.....	101
Figura 30. Heatmap representativo de los genes de interés en ratas expuestas a 14 días de hipoxia sostenida y a 14 días de hipoxia intermitente crónica. ....	102
Figura 31. Modelo propuesto de inducción de STOC a partir de los 21 días de CIH. ....	108
Figura 32. Modelo especulativo de la acción de 2-APB.....	114
Figura 33. Modelo especulativo de la acción de Tempol (30 mg/kg/día) en animales expuestos a CIH.....	118

Figura 34. Resumen. .... 123

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Modelos pre-clínicos de AOS presentan hipertensión arterial pulmonar.....	25
Tabla 2. Secuencia y características de los partidores usados en el análisis. ....	42
Tabla 3. Factores involucrados en la modulación génica y protéica de las subunidades formadoras de STOC. ....	100
Tabla 4. Resumen de los efectos de CIH sobre parámetros cardiovasculares y subunidades STOC. ....	107

**ABREVIATURAS**

2-APB	2-aminoetildifenilborinato
5-HT	Serotonina
AHI	Indice Apnea/hipoapnea
AOS	Apnea Obstructiva del sueño
BMP4	Proteína Morfogenética ósea 4
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CAT	Catalasa
CC	Cuerpo Carotideo
CIH	Hipoxia Intermitente Crónica
Epo	Eritropoyetina
ET-1	Endotelina-1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HIF-1 $\alpha$	Factor inducible por hipoxia 1 $\alpha$
HIF-2 $\alpha$	Factor inducible por hipoxia 2 $\alpha$
HIFs	Factores inducibles por hipoxia
HO-1	Hemoxygenasa-1
HP	Hipertensión Pulmonar
HRE	Elementos de Respuesta a Hipoxia
IP3R	Canales intracelulares de calcio sensibles a IP3
mPAP	Presión de la arteria Pulmonar media

NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
NOX2	NADPH oxidasa 2
NRF2	Factor Nuclear Derivado del Eritroide 2
ORAI1	Proteína 1 del Canal de Calcio Activado por Liberación de Calcio
ORAI2	Proteína 2 del Canal de Calcio Activado por Liberación de Calcio
PASMC	Células Musculares Lisas de las Arterias Pulmonares
PHD2	Prolilhidroxilasa 2
RAS	Sistema Renina-Angiotensina
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
RVSP	Presión Sistólica Ventricular Derecha
RyR	Receptores de Rianodina
sPAP	Presión Arterial Pulmonar Sistólica
SOC	Canales Operados por Depósito
SOCE	Entrada de Calcio Operada por Depósito
SOD	Superóxido dismutasa
STIM1	Moléculas de interacción estromal 1
STIM2	Moléculas de interacción estromal 2
TRPC	Canales Transitorios de Potencial Canónico
TOS	Canales TRPC-ORAI activados por STIM
VEGF	Factor de Crecimiento Vascular de endotelio
VHL	Von Hippel-Lindeau
VPH	Vasoconstricción Pulmonar Hipóxica

## RESUMEN

La apnea obstructiva del sueño (AOS) es un trastorno respiratorio del sueño caracterizado por episodios de hipoxia crónica intermitente (CIH). La AOS normalmente se asocia con somnolencia y daño cognitivo, pero es un riesgo independiente de sufrir hipertensión sistémica, y se asocia con la hipertensión pulmonar (HP). De hecho, entre el 20 y el 50% de los pacientes con AOS desarrollaron HP leve. Se ha propuesto que los factores inducibles por hipoxia (HIF), el estrés oxidativo y la desregulación del calcio contribuyen al remodelado vascular y la HP inducida por la CIH. La entrada de calcio vía canales TRPC-ORAI activados por STIM (STOC) juega un rol importante en la fisiología y la fisiopatología de la circulación pulmonar, acumulándose nuevas evidencias de su contribución a la respuesta vasoconstrictora de las arterias pulmonares y a la proliferación de células musculares lisas pulmonares (PASMC) durante la hipoxia sostenida. En esta tesis propongo la hipótesis que “La hipoxia intermitente produce un aumento de los niveles de los canales “TRPC-ORAI activados por STIM (STOC)”, los cuales contribuyen a la remodelación vascular y al desarrollo de hipertensión pulmonar, siendo un mecanismo independiente del estrés oxidativo”.

Estudiamos el curso-temporal de la remodelación vascular pulmonar, la HP y la expresión de STOC en ratas macho Sprague-Dawley (200 g) expuestas a CIH (O<sub>2</sub> al 5% 10 veces/h durante 8 h, por 14, 21 y 28 días. La exposición a CIH produjo un aumento progresivo de la presión sistólica del ventrículo derecho (RVSP > 30 mmHg), remodelación vascular y respuestas contráctiles potenciadas a KCl y a ET-1, que fueron significativas a los 21 días de CIH. La

expresión de genes y proteínas pulmonares de los canales TRPC 6, ORAI 1, ORAI 2 y STIM 1 aumentó a los 21-28 días, en paralelo con los cambios morfológicos y funcionales.

Evaluamos los efectos de 2-aminoetildifenilborinato (2-APB), un bloqueador de STOC, sobre la remodelación vascular pulmonar y la HP. A los 14 días de CIH, se implantaron bombas osmóticas con 2-APB (10 mg/kg día) o su vehículo y las ratas se mantuvieron en CIH durante 14 días más. El tratamiento con 2-APB previno el aumento de RVSP, la remodelación vascular, el aumento de los niveles de  $\alpha$ -actina en pequeñas arterias pulmonares y la positividad del marcador de proliferación celular a Ki-67. Además, 2-APB impidió el aumento de la expresión génica pulmonar de las subunidades STOC. Sin embargo, 2-APB no previno el estrés oxidativo sistémico y pulmonar. Los resultados sugieren que STOC juega un papel clave en el desarrollo de la remodelación vascular y la HP inducida por CIH y que estos cambios son independientes a los niveles de estrés oxidativo.

Evaluamos los efectos Tempol, un mimético de la superóxido dismutasa con acción anti-oxidante sobre la remodelación vascular pulmonar, la vasoconstricción de pequeñas arterias, su efecto anti-oxidante y la expresión de los canales STOC a nivel pulmonar. A los 14 días de CIH, se implantaron bombas osmóticas con Tempol (30 mg/kg/día) o su vehículo (NaCl 0,9%) y las ratas se mantuvieron en CIH durante 14 días más. El tratamiento con Tempol previno parcialmente el aumento de la remodelación vascular, y la vasoconstricción a concentraciones crecientes a ET-1. Además, Tempol impidió el aumento de la expresión génica pulmonar de las subunidades TRPC1 y TRPC4 sobreexpresadas. Tempol previno el estrés oxidativo a nivel sistémico pero no a nivel el pulmonar. Los resultados son compatibles que los efectos de Tempol no se deban a una reducción del estrés oxidativo a nivel pulmonar, si no que se

podrían asociarse a una disminución en la expresión génica de las subunidades de STOC y en la disminución la contracción máxima a ET-1.

Finalmente, mediante un análisis bioinformático realizado en la base de datos disponibles en la plataforma GEO, encontramos un array el cual contenía RNA de pulmón de ratas Sprague-Dawley expuestas a 14 días de hipoxia sostenida (14d-SH), 14 días de hipoxia intermitente crónica (14d-CIH) y animales controles. En estos tres grupos estudiamos mediante herramientas bioinformáticas la expresión diferencial de genes que están involucrados en la regulación génica de los STOC. Los principales hallazgos que arrojaron estos análisis fueron que las ratas expuestas a 14d-CIH presentan una sobre expresión de genes involucrados en la modulación de los STOC, tales como BMP2, NF $\kappa$ B, ORAI1 y una disminución en genes que inhiben la acción de estos canales como lo es PPAR $\gamma$ . Por el contrario, animales expuestos a 14 días de hipoxia sostenida, solo presentaron una disminución de la SOD2. Estos resultados sugieren que los animales expuestos a CIH presentan un elevado patrón de expresión temprana a la regulación de genes involucrados en la regulación de STOC, que los animales expuestos a SH.

En resumen, los resultados indican que 2-APB previene fuertemente las alteraciones vasculares pulmonares inducidas por CIH, lo que sugiere que la inhibición de STOC puede potencialmente usarse para tratar la hipertensión pulmonar inducida por AOS.

## ABSTRACT

Obstructive sleep apnea (OSA) is a sleep breathing disorder characterized by chronic intermittent hypoxia (CIH). OSA is related to drowsiness and cognitive impairment, but it is recognized as an independent risk of systemic hypertension. Furthermore, OSA is associated with mild pulmonary hypertension (PH). Indeed, between 20-50% of OSA patients developed mild PH. Hypoxia-inducible factors (HIF), oxidative stress, and calcium dysregulation have been proposed to contribute to CIH-induced vascular remodeling and PH. The calcium entry via STIM-activated TRPC-Orai channels (STOC) plays a significant role in the physiology and pathophysiology of the pulmonary circulation. Indeed, new evidence supports an important role of STOC on the vasoconstrictor response of the pulmonary arteries, as well as on the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) in sustained hypoxia. Accordingly, I hypothesized that "Chronic intermittent hypoxia induces an increase in the levels of STIM-activated TRPC-Orai channels (STOC) channels, which contribute to vascular remodeling and the development of pulmonary hypertension, being an independent mechanism of oxidative stress."

We studied the temporal-course of pulmonary vascular remodeling, PH, and STOC expression in lungs from male Sprague-Dawley rats (200 g) exposed to CIH (5% O<sub>2</sub> 10 times /h for 8 h) for 14, 21, and 28 days. CIH produced a progressive increase in right ventricular systolic pressure (RVSP > 30 mm Hg), vascular remodeling, and enhanced the contractile responses to KCl and ET-1, which were significant at 21-28 days of CIH. The gene pulmonary expression and proteins of the TRPC 6, Orai 1, Orai 2, and STIM 1 channels increased at 21-28 days and paralleled the morphological and cardiopulmonary functional changes.

We subsequently evaluated the effects of 2-aminoethyl-diphenyl borinate (2-APB), a STOC blocker, on pulmonary vascular remodeling and PH in this model. At 14 days of CIH, osmotic pumps were implanted with 2-APB (10 mg/kg day) or its vehicle and the rats were kept in CIH for 14 days more. Treatment with 2-APB prevented the increase in RVSP, vascular remodeling, increased levels of  $\alpha$ -actin immunoreactivity in small pulmonary arteries, and positivity PASCAM for Ki67, a marker of cell proliferation, processes induced by CIH. Furthermore, 2-APB prevented the increase in pulmonary gene expression of the STOC subunits. However, 2-APB did not prevent both systemic and pulmonary oxidative stress. Present results suggest that STOC plays a key role in the development of vascular remodeling and CIH-induced PH and that these changes are independent of oxidative stress.

We evaluated the effects 4-hydroxy-TEMPO (Tempol), a superoxide dismutase mimetic with anti-oxidant action on the CIH-induced pulmonary vascular remodeling, enhanced vasoconstriction of small arteries, anti-oxidant effect, and the expression of the channels STOC in the lung. At 14 days of CIH, osmotic pumps were implanted with Tempol (30 mg/kg/day) or its vehicle (0.9% NaCl) and the rats were kept in CIH for a further 14 days. Tempol treatment partially prevented the vascular remodeling and vasoconstriction at increasing concentrations of ET-1. Furthermore, Tempol prevented the increase in lung gene expression of the overexpressed TRPC1 and TRPC4. Tempol prevented oxidative stress at the systemic level but not at the pulmonary level. Present results suggest that the changes induced by Tempol as partial prevention of oxidative stress, are not due to a reduction in oxidative stress at the pulmonary level, but could be associated with a decrease in the gene expression of STOC and subunits and a decreasing in the maximal contraction to ET-1.

Finally, using a database available on the GEO platform, we found an array that contained lung RNA from Sprague-Dawley rats exposed to 14 days of sustained hypoxia (14d-SH), 14 days of chronic intermittent hypoxia (14d-CIH), and control animals. In these three groups, we studied the differential expression of genes that participate in the gene regulation of STOCs using bioinformatic tools. The main findings that these analyzes yielded were that the rats exposed to 14d-CIH present an early overexpression of genes involved in the modulation of STOCs, such as BMP2, NF $\kappa$ B, ORAI1, and a decrease in PPAR $\gamma$ , a negative regulator of STOC. On the contrary, animals exposed to 14 days of sustained hypoxia only showed a decrease in SOD2. These results suggest that the animals exposed to CIH present an early expression pattern to the regulation of genes involved in the regulation of STOC than the animals exposed to SH.

In summary, the results indicate that 2-APB strongly prevents CIH-induced pulmonary vascular disorders, suggesting that STOC inhibition can potentially be used to treat OSA-induced pulmonary hypertension.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Hipertensión pulmonar hipóxica: Definición y características generales.

Una característica exclusiva de la circulación pulmonar es la “vasoconstricción pulmonar hipóxica”, que es una respuesta contráctil rápida y reversible de las arterias pulmonares, cuya intensidad y duración es proporcional al estímulo hipóxico al que se encuentran sometidas, y ocurre independientemente de factores neurales o humorales (Sylvester *et al.*, 2012). Se ha propuesto que la vasoconstricción pulmonar hipóxica redistribuye el flujo sanguíneo desde áreas poco oxigenadas hacia áreas con mayor oxigenación, con el fin de optimizar la razón ventilación/perfusión en el territorio pulmonar (Dunham-Snary *et al.*, 2017; Hussain *et al.*, 2017). Como consecuencia de la mantención del estímulo hipóxico, las arterias pulmonares pueden desarrollar una respuesta mal-adaptativa, caracterizada por remodelamiento vascular caracterizado por la hiperplásica y/o hipertrófica de las células musculares lisas de las arterias pulmonares (PASMC), desencadenando hipertensión pulmonar (HP) (Suresh and Shimoda, 2016). La hipertensión pulmonar se define como el aumento de la presión arterial pulmonar media (mPAP) sobre 20 mmHg o una presión arterial pulmonar sistólica (sPAP) sobre 30 mmHg en reposo normóxico, junto con remodelamiento vascular pulmonar (Simoneau *et al*

2019). Esta alteración hemodinámica conduce frecuentemente a una hipertrofia del ventrículo derecho, insuficiencia cardiaca y muerte (Galié *et al.*, 2010).

De acuerdo con el 5° Simposio Mundial de Hipertensión Pulmonar realizado en Nice, Francia, en el Grupo 3 de las causas de la hipertensión pulmonar está la hipoxia como un factor de riesgo para el desarrollo de hipertensión pulmonar (Simonneau *et al.*, 2019). Aunque la apnea obstructiva del sueño (AOS) está clasificada entre las enfermedades asociadas a la hipertensión pulmonar del grupo 3, existen escasos estudios sobre los mecanismos involucrados en el desarrollo de la hipertensión pulmonar.

### **1.2. Apnea obstructiva del sueño e hipertensión pulmonar hipóxica.**

La apnea obstructiva del sueño (AOS) es un desorden respiratorio del sueño que se caracteriza por episodios de hipoxia intermitente crónica (CIH). La CIH es causada por la obstrucción parcial o total del flujo de aire a nivel de la faringe, lo que resulta en una disminución de la presión parcial de oxígeno ( $PO_2$ ) y de la saturación de oxígeno ( $SPO_2$ ) durante el sueño. La disminución en la  $PO_2$  es detectada por el cuerpo carotideo (CC) que produce un aumento reflejo de la actividad contráctil de los músculos respiratorios, presión intratorácica negativa, activación simpática y un aumento de la presión arterial, y finalmente se produce un micro despertar y se restituye el flujo de aire (Dempsey *et al.*, 2010, Gozal *et al.*, 2008, Somers *et al.*, 2008). Este ciclo de hipoxia y reoxigenación es la base fisiopatológica de la AOS. Estudios epidemiológicos demuestran que la AOS afecta al 5%-20% de la población mundial, y está reconocida como un riesgo independiente para desarrollar de hipertensión sistémica (Bosc *et*

*al.*, 2010, Somers *et al.*, 2008; Young *et al.*, 1993). De hecho, un 50% de los pacientes con AOS desarrollan hipertensión arterial (Somers *et al.*, 2008; Young *et al.*, 1993) y entre un 20% a un 50% desarrollan hipertensión pulmonar moderada, sin antecedentes de enfermedades cardiopulmonares previas (Bosc *et al.*, 2010, Floras, 2018, ME *et al.*, 2013, Schäfer *et al.*, 1998, Somers *et al.*, 2008).

Se ha propuesto que un aumento de la actividad simpática, el estrés oxidativo y la inflamación contribuyen a las alteraciones cardiovasculares sistémicas en AOS (Gozal *et al.*, 2008, Somers *et al.*, 2008, Dempsey *et al.*, 2010, Iturriaga 2018, Iturriaga *et al.*, 2021). El modelo preclínico más usado para estudiar los mecanismos patológicos son roedores expuestos a CIH (5-6% O<sub>2</sub>, 10-12 veces /h por 8 h) por periodos de 7-35 días (Fletcher *et al.*, 1992, Iturriaga *et al.*, 2009, Peng *et al.*, 2003, Harki *et al.*, 2021). Usando este modelo, se ha demostrado en ratas y ratones que la exposición entre 28 y 56 días de CIH induce un aumento en la presión sistólica ventricular derecha (> 30 mmHg), remodelamiento vascular pulmonar y un aumento en el índice hipertrófico ventricular derecho (ver Iturriaga y Castillo-Galán, 2019) (Tabla 1).

Tabla 1. Modelos pre-clínicos de AOS presentan hipertensión arterial pulmonar.

Animal Model	CIH Exposition	Cardiovascular variables	Refs.
Sprague-Dawley (300-400g)	4% O <sub>2</sub> 90s 21% O <sub>2</sub> 90s 8h/day x 28 days	↑RVSP (~37,5 mmHg) ↑Fulton index ↑P. A. Remodeling	Nara et al., 2015
Sprague-Dawley (200-250g)	10% O <sub>2</sub> 10h/day x 28 days	↑RVSP (~35 mmHg) ↑Fulton index ↑P. A. Remodeling ↑Lung SM- $\alpha$ -actin	Jin et al., 2016
Sprague-Dawley (200-250g)	10% O <sub>2</sub> 10h/day x 28 days	↑RVSP (~35 mmHg) ↑Fulton index ↑P. A. Remodeling	Jin et al., 2014
Sprague-Dawley (180-220g)	6% O <sub>2</sub> x 10s 21% O <sub>2</sub> x 80s 8h/day x 35 days	↑mPAP (27 mmHg)	Xu et al., 2015
Mice (8 weeks old)	5% O <sub>2</sub> 21% O <sub>2</sub> 56 days	↑P. A. Remodeling	Cho et al., 2017
Mice (8 weeks old)	10% O <sub>2</sub> 21% O <sub>2</sub> 8h/day x 56 days	↑RVSP (32 mmHg) ↑Fulton index ↑P. A. Remodeling	Nisbet et al., 2008

Fulton index: RV/S+LV; RVSP: right ventricular systolic pressure; P.A Remodeling: Pulmonary artery remodeling

Tomada de Iturriaga y Castillo-Gálan, 2020.

Sin embargo, y a pesar de la relación establecida entre la exposición a CIH y la disfunción vascular pulmonar, los mecanismos específicos no se conocen completamente, centrándose los estudios principalmente en la circulación sistémica.

### 1.3. HIF y ROS: Rol en la hipertensión pulmonar hipóxica.

Considerando los episodios cíclicos de hipoxia y re-oxigenación que son característicos de la AOS, se ha propuesto que el factor inducido por hipoxia (HIF) y las especies reactivas de

oxígeno (ROS), podrían jugar un rol importante en el desarrollo de la hipertensión pulmonar inducida por CIH (Nara *et al.*, 2014, Nisbet *et al.*, 2008, Jin *et al.*, 2014, Jin *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2018, Yang *et al.*, 2016). La respuesta génica a la hipoxia es comandada por una familia de factores de transcripción inducidos por hipoxia (HIFs) que funcionan como heterodímeros. Estos complejos se componen de una subunidad  $\alpha$  (HIF $\alpha$ ), regulada por oxígeno y una subunidad  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ ) que es expresada constitutivamente (Semenza, 1999). Bajo condiciones normóxicas, HIF $\alpha$  es hidroxilada por la prolihdroxilasa 2 (PHD2), lo que permite la unión de la proteína Von Hippel-Lindeau (VHL), promoviendo su ubiquitación y degradación (Ivan *et al.*, 2001, Jaakkola *et al.*, 2001). La hipoxia disminuye la actividad de las PHD2, permitiendo la traslocación nuclear de HIF $\alpha$ , donde heterodimeriza con la subunidad  $\beta$ , uniéndose a las secuencias promotoras de genes que presentan elementos de respuesta a hipoxia (HRE) tales como; el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), la eritropoyetina (Epo) y endotelina-1 (ET-1), entre otros (Eguchi *et al.*, 1997, Manalo *et al.*, 2005, Prabhakar y Semenza, 2012, Semenza, 2002, Shimoda y Semenza, 2011). De las tres isoformas conocidas de HIF $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  han sido las más estudiadas, estando esta última expresada abundantemente en el territorio pulmonar (Copernolle *et al.*, 2002).

Varios estudios han demostrado la participación de las isoformas HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  en el desarrollo de la hipertensión pulmonar y el remodelamiento vascular pulmonar. Abud y cols., 2012 demostraron que la administración de digoxina, un inhibidor inespecífico de HIF, en ratas expuestas a hipoxia sostenida por 21 días, reducía tanto la hipertensión pulmonar como el índice hipertrófico ventricular derecho en comparación a los controles hipóxicos (Abud *et al.*, 2012). Aún más, ratones HIF-1 $\alpha$  <sup>+/-</sup> expuestos a hipoxia sostenida por 21 días, no

presentaron un incremento de la presión sistólica ventricular derecha, y el remodelamiento vascular pulmonar fue menor en comparación a los controles “wild type” (WT) hipóxicos. Sin embargo, estos animales presentan un aumento del índice hipertrófico derecho (Yu *et al.*, 1999). De similar manera, ratones HIF-2 $\alpha$ <sup>+/-</sup> a pesar de estar expuestos a hipoxia sostenida por 28 días, no presentaron un aumento de la presión sistólica ventricular derecha, ni un remodelamiento vascular pulmonar, ni un aumento en marcadores de hipertrofia cardiaca derecha, en relación a los controles WT hipóxicos (Brusselmans *et al.*, 2003). Aún más, ratones HIF-1 $\alpha$ <sup>+/-</sup> y HIF-2 $\alpha$ <sup>+/-</sup> expuestos a hipoxia sostenida por 21 días, presentaron una atenuación del incremento en la presión sistólica ventricular derecha y del remodelamiento vascular pulmonar por sobre el grupo WT hipóxico, siendo el grupo HIF-2 $\alpha$ <sup>+/-</sup> el que presentó una mayor atenuación en relación al grupo HIF-1 $\alpha$ <sup>+/-</sup> (Cowburn *et al.*, 2016). Estos resultados sugieren que HIF, y en específico la isoforma HIF-2 $\alpha$ , sería el principal mediador del desarrollo de la remodelación vascular y la hipertensión pulmonar en condiciones de hipoxia sostenida. Por otra parte, se sabe que las ROS pueden aumentar por una exposición a hipoxia. En estas condiciones las principales fuentes que generan ROS son: el desacople del complejo III de la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, la NADPH, y el aumento de los niveles de enzimas pro-oxidantes (Guzy *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2016). Los niveles elevados de ROS inducen un incremento del calcio intracelular, proceso cardinal en la disfunción vascular y en los cambios morfológicos, como la proliferación de PASMC, generando remodelamiento vascular pulmonar, aumento de la vasoconstricción arterial pulmonar y finalmente hipertensión pulmonar (Humbert *et al.*, 2004, Reyes *et al.*, 2018, Shao *et al.*, 2016, Sylvester *et al.*, 2012, Waypa *et al.*, 2002).

En el contexto de modelos animales de AOS, la evidencia experimental muestra que en ratas expuestas a 28 días de CIH que presentan remodelamiento vascular e hipertensión pulmonar, se produce también un aumento en la expresión génica y los niveles proteicos de HIF-1 $\alpha$  en el pulmón (Jin *et al.*, 2014). Por otro lado, la exposición de roedores a 28 días de CIH induce estrés oxidativo sistémico, caracterizado por un aumento del nivel de peroxidación de lípidos y la nitración de proteínas (Nara *et al.*, 2014, Jin *et al.*, 2016, Yang *et al.*, 2016), y de enzimas pro-oxidantes a nivel pulmonar, como NOX2 y NOX4 (Nisbet *et al.*, 2008). Esto se suma a una disminución tanto en la actividad como en los niveles de agentes reductores, tales como la enzima superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), el factor de transcripción NRF2 y homoxigenasa-1 (HO-1) (Jin *et al.*, 2016, Lu *et al.*, 2016, Yang *et al.*, 2016, Zhang *et al.*, 2018).

Estos antecedentes sugieren que la exposición a CIH induce estrés oxidativo y un aumento en los niveles de HIF-1 $\alpha$  a nivel pulmonar. Sin embargo, la contribución de HIF-2 $\alpha$  en el remodelamiento y disfunción vascular pulmonar resultante de la exposición a hipoxia intermitente crónica no está bien establecida

#### **1.4. Papel del calcio intracelular en las células musculares lisas de las arterias pulmonares y en la hipertensión arterial pulmonar.**

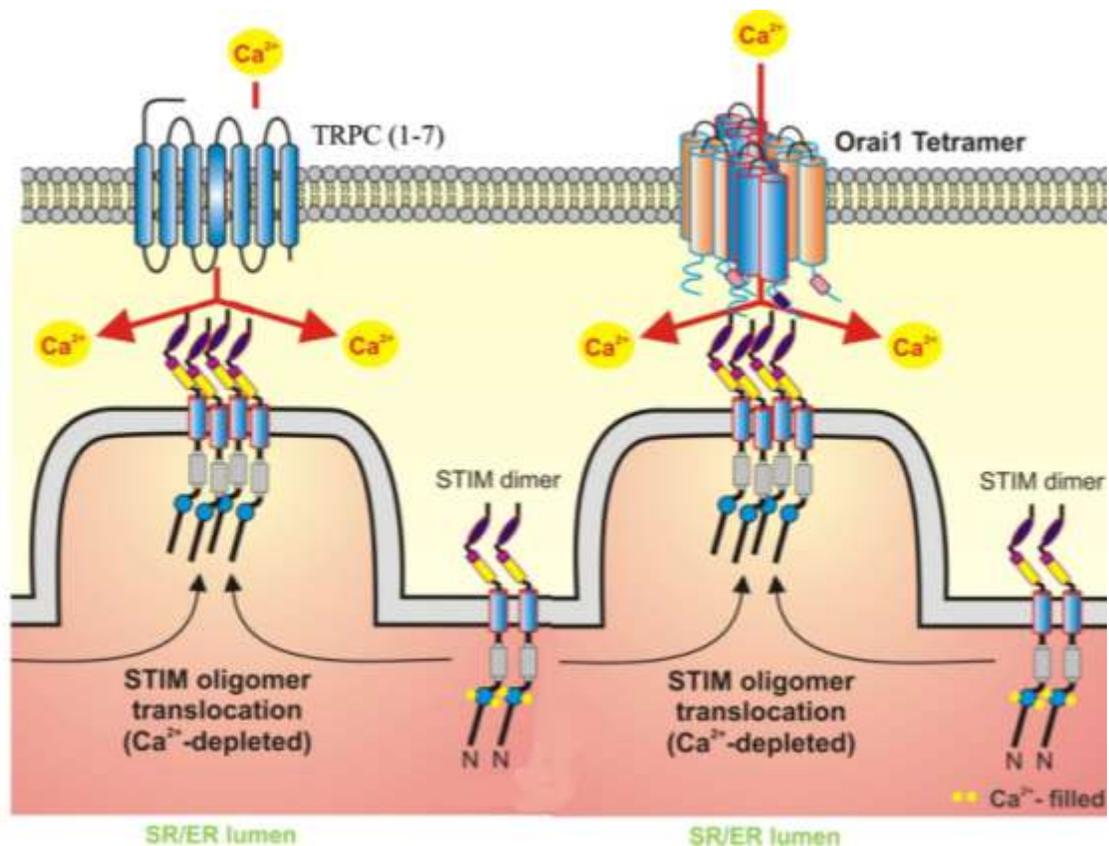
La señalización del calcio es un evento clave en los procesos de contracción, diferenciación y proliferación del musculo liso vascular. Estos procesos celulares pueden ser modificados por hipoxia o ROS entre otros estímulos, contribuyendo al desarrollo de la hipertensión pulmonar (Guibert *et al.* 2011; Sommer *et al.*, 2015, Ward y McMurtry, 2009; Waypa *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2010). El Ca<sup>2+</sup> citoplasmático en las células vasculares musculares lisas puede aumentar

por liberación desde depósitos del retículo sarcoplasmático mediada por canales intracelulares sensibles a inositol trisfosfato ( $IP_3$ ), por activación de receptores de rianodina (RyR); o por la entrada de calcio desde el espacio extracelular. Esto último puede ocurrir por la operación reversa del intercambiador  $Na^+/Ca^{+2}$  (NCX), por canales de calcio dependientes de voltaje tipo L o T, o a través de canales independientes de voltaje. Estos últimos incluyen: canales activados por estiramiento mecánico; por canales activados por interacción ligando-receptor y por canales activados por la disminución de calcio en los almacenes del retículo sarcoplasmático (“Store operated channels SOC”). En los últimos años, la atención se ha centrado en el papel que juegan los SOC en la fisiología y la fisiopatología de la circulación pulmonar, acumulándose nuevas evidencias sobre su contribución a la respuesta vasoconstrictora de las arterias pulmonares, así como a la proliferación de PASMC, lo que los convierte en una “diana molecular” para aminorar la hipertensión pulmonar (Castillo-Galán *et al.*, 2016, Golovina *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2006; Weigand *et al.*, 2005).

### **1.5. Canales TRPC-ORAI activados por STIM (STOC): Vasoconstricción pulmonar hipóxica, remodelamiento vascular pulmonar e hipertensión pulmonar.**

Los SOC incluyen canales catiónicos de la membrana plasmática activados por el vaciamiento de los almacenes de calcio en el retículo sarcoplasmático, permitiendo el ingreso de  $Ca^{2+}$  desde el medio extracelular y contribuyendo a acelerar la reposición del  $Ca^{2+}$  reticular (Reyes *et al.*, 2018). El vaciamiento de los depósitos reticulares, que gatilla la activación de SOC, puede ocurrir por la acción de ET-1 o serotonina (5-HT), que al unirse a sus receptores

producen el segundo mensajero IP<sub>3</sub>, que a su vez activa canales intracelulares de calcio en el retículo sarcoplásmico (IP<sub>3</sub>R) (Zhang *et al.*, 2003). Desde el punto de vista estructural, los SOC se pueden componer principalmente por un homo o heterotetrámero de subunidades formadoras de poros pertenecientes a la familia TRPC (TRPC1 a 7), o a la familia ORAI (ORAI 1 a 3), entre otras (Ambudkar *et al.*, 2017, Reyes *et al.*, 2018). Por otra parte, una subunidad auxiliar de la familia de moléculas de interacción estromales (STIM 1 y 2) actúa como sensor de calcio activando subunidades formadoras de poros en respuesta al agotamiento de calcio de los depósitos del retículo sarcoplasmático (Fuchs *et al.*, 2010; Johnstone *et al.*, 2010; Wray y Burdyga, 2010; Yang *et al.*, 2010). En este trabajo se denominará STOC a los “Store Operated Channels”, conformados específicamente por subunidades TRPC, ORAI y STIM. Desde el punto de vista funcional, la sub-unidad intrareticular “*EF-hand*” de STIM detecta el vaciamiento de calcio reticular, homodimerizando y translocando a regiones “*punctae*” del retículo sarcoplasmático, ubicadas en las proximidades de la membrana plasmática. Esta traslocación permitirá la formación del complejo STIM1-ORAI, el cual generará corrientes de calcio activadas por calcio ( $I_{crac}$ ) provenientes del espacio extracelular (Huang *et al.*, 2006). Estas oscilaciones selectivas a  $Ca^{+2}$  son necesarias para el posterior reclutamiento de subunidades TRPC, para luego formar complejos STIM-TRPC generando nuevas, pero menos selectivas, corrientes de  $Ca^{2+}$  (Alicia *et al.*, 2008). La formación de complejos hetero u homotetrámeros de TRPC-ORAI-STIM, resulta en una elevación sostenida de corrientes de  $Ca^{2+}$ , denominada “entrada de calcio operada por depósito” (SOCE) (Ambudkar *et al.*, 2017; Putney, 2017) (ver Figura 1).



**Figura 1. Modelo de activación de STOC.** En condiciones basales el  $\text{Ca}^{2+}$  se encuentra almacenado dentro del retículo, STIM y ORAI se encuentran dispersos en la membrana reticular y los TRPC en la membrana plasmática. El vaciamiento reticular de calcio promueve la heterodimerización y acumulación de STIM en regiones *punctae* de la membrana reticular. Al mismo tiempo ORAI y TRPC heterodimerizan y se acumulan en regiones de la membrana plasmática opuestas al “cluster” de STIM. STIM se une a ORAI y/o TRPC, activándolos, permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al espacio intracelular, proceso denominado SOCE. (Modificado de Kuhr, 2012).

La farmacología de los STOC aún está en desarrollo, y desde hace varios años se han descrito bloqueadores como el 2-aminodifenilborinato (2-APB), que inhibe la interacción STIM-ORAI. Estudios han demostrado que el tratamiento *in vivo* con 2-APB atenúa significativamente el remodelamiento pulmonar, el aumento de RVSP y la hipertrofia ventricular derecha en ratones expuestos durante 4 semanas a hipoxia sostenida, en comparación con animales hipóxicos tratados con vehículo (Smith *et al.*, 2015). Además, en un modelo de hipertensión pulmonar neonatal, la infusión diaria de 2-APB redujo el remodelamiento vascular pulmonar e hipertensión pulmonar inducida por la hipoxia pregestacional en corderos recién nacidos en la altura (Castillo-Galán *et al.*, 2016).

En resumen, en la última década se ha descrito la participación de STOC en la contracción de arterias pulmonares en respuesta a hipoxia aguda y sostenida (Castillo-Galán *et al.*, 2016, Guibert *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2008; Lu *et al.*, 2009; Ng *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006; Weigand *et al.*, 2005). Más aún, la entrada de calcio mediada por STOC podría ser el principal mediador de la vasoconstricción pulmonar hipóxica, y participarían en procesos celulares cardinales para el remodelamiento arterial pulmonar patológico, como la diferenciación y proliferación de PASMC (Castillo-Galán *et al.*, 2016, Golovina *et al.*, 2001; Hou *et al.*, 2013).

### **1.6. HIF y ROS: Moduladores de la expresión y función de canales STOC.**

Existen estudios que sugieren que la activación de HIF y el aumento del estrés oxidativo, inducidos por la hipoxia y re-oxigenación características de CIH, podrían inducir la expresión

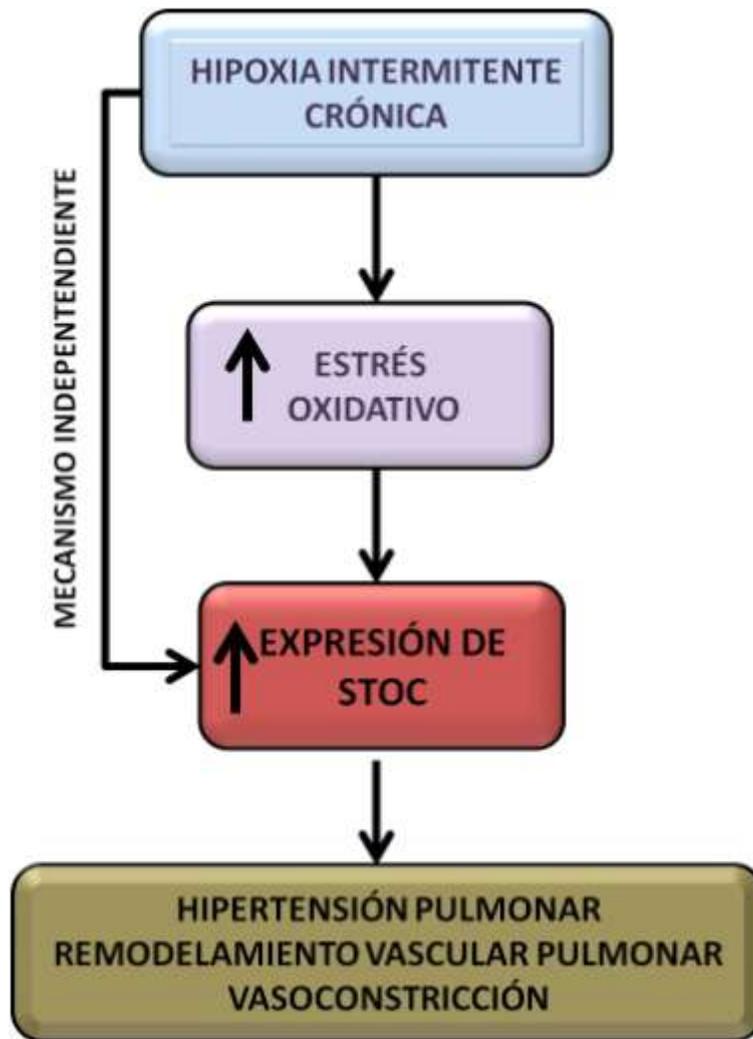
y la activación de los canales STOC. Ratones expuestos a 21 días de hipoxia sostenida, presentan un incremento en la expresión pulmonar génica y proteica de HIF-1 $\alpha$ , ORAI1, ORAI2 (Wang *et al.* 2017), TRPC1, TRPC6 (Wang *et al.* 2006, Wang *et al.* 2015) y STIM1 (Hou *et al.*, 2013). Además, el aumento de los niveles de TRPC1, TRPC6 y ORAI2 a nivel pulmonar en ratones HIF-1 $\alpha$  +/- sometidos a 21 días de hipoxia sostenida, es menor que en el grupo WT, sugiriendo una modulación de HIF-1 $\alpha$  sobre TRPC1, TRPC6 y ORAI2, y no así de ORAI1 (Wang *et al.* 2006, Wang *et al.* 2017). Por el contrario, el papel de HIF-2 $\alpha$  en la modulación de estos canales y el posible rol que jugaría en el desarrollo de la hipertensión pulmonar no han sido estudiados.

Se ha demostrado que el estrés oxidativo induce un aumento tanto en la expresión de los STOC como en la entrada de calcio dependiente de los STOC. Específicamente, en PASMC de rata la activación de TRPC1 y TRPC6 por el factor de transcripción BMP4 depende del incremento de los ROS, mediado por NOX4 (Jiang *et al.*, 2014). A su vez, se ha propuesto que el aumento de ROS, inducido por hipoxia, activa a los RyR, lo que induce una salida del Ca<sup>2+</sup> reticular, activando a STIM1, permitiendo a vez la interacción con ORAI en la membrana plasmática y posterior activación de los STOC (Sommer *et al.*, 2016; Suresh y Shimoda, 2016). También, se ha demostrado en PASMC aislados de ratas, que el aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultante de la exposición a 24 y 48 horas de hipoxia, induce un aumento en la expresión génica y proteica de TRPC1, STIM1 y ORAI1, promueve la activación de STIM1 y posterior interacción con ORAI1 y TRPC1, induciendo un aumento de SOCE (Chen *et al.*, 2017). Por otra parte, se encontró en células COS 7 transfectadas con STIM1, que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promueve la

activación de STIM1, de manera independiente al vaciamiento de calcio reticular (Hawkins *et al.*, 2010).

En resumen, los datos indican que roedores expuestos a 28 días de CIH desarrollan un aumento de la presión sistólica ventricular derecha ( $> 30$  mm Hg) y remodelamiento vascular pulmonar. Además, la exposición a la CIH produce estrés oxidativo a nivel pulmonar. Por otra parte, se ha demostrado que tanto un aumento en el estrés oxidativo como de HIF-1 $\alpha$  modulan la expresión, la entrada de calcio y contracción dependiente de los canales STOC, que juegan un papel fundamental en el desarrollo de la hipertensión arterial pulmonar animales expuestos a hipoxia sostenida. Además, en ratones expuestos a hipoxia sostenida se ha documentado un rol preponderante de HIF-2 $\alpha$  por sobre HIF-1 $\alpha$ , como mediador de la HP. Sin embargo, se desconoce tanto la contribución de HIF-2 $\alpha$  en el remodelamiento y disfunción vascular pulmonar resultante de la exposición a CIH como su el posible rol modulador de los STOC. A pesar de la evidencia expuesta, se desconoce el rol específico que cumplen los STOC en el desarrollo de la hipertensión pulmonar y remodelamiento vascular pulmonar asociado a la CIH, así como la modulación de su expresión y activación por y ROS.

Por lo tanto, la evidencia sugieren la expresión y la vasoconstricción inducida por los canales STOC a nivel vascular pulmonar, independiente del estrés oxidativo, induce hipertensión pulmonar y remodelamiento vascular en ratas expuestas a hipoxia intermitente crónica (Figura 2).



**Figura 2. Modelo propuesto del aumento de expresión de STOC.**

Según los antecedentes descritos anteriormente, nosotros proponemos que la CIH induce un aumento de los niveles de STOC, los cuales contribuyen al remodelamiento vascular, hipertensión pulmonar, siendo un mecanismo independiente del estrés oxidativo.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN**

### **2.1 Hipótesis.**

La hipoxia intermitente produce un aumento progresivo de los niveles de los canales “TRPC-ORAI activados por STIM (STOC)”, los cuales contribuyen a la remodelación vascular y al desarrollo de hipertensión pulmonar, siendo un mecanismo independiente del estrés oxidativo.

### **2.2. Objetivo General:**

Determinar si la disfunción vascular pulmonar inducida por exposición a hipoxia intermitente crónica, dependen de los STOC, si esta es independiente del estrés oxidativo.

### **2.3 Objetivos específicos:**

En un modelo de ratas hipertensas pulmonares por exposición a CIH:

2.2.1. Determinar el curso temporal de los efectos de CIH sobre la presión pulmonar, el remodelamiento vascular pulmonar, la disfunción cardiopulmonar, y los niveles génicos y proteicos de STOC a nivel pulmonar.

2.2.2. Determinar los efectos de la inhibición de STIM-ORAI sobre la presión arterial pulmonar y el remodelamiento vascular y el estrés oxidativo.

2.2.3. Determinar los efectos del agente antioxidante Tempol sobre la expresión de STOC a nivel pulmonar, la vasoconstricción pulmonar y remodelamiento vascular pulmonar.

2.2.4 Analizar y comparar la expresión diferencial de factores que regulen la transcripción de STOC en el pulmón de animales expuestos a hipoxia sostenida e intermitente, mediante herramientas bioinformáticas.

### **3. METODOLOGÍA**

#### **3.1 Protocolos aprobados de cuidado animales y bioseguridad**

Los protocolos experimentales en ratas y células fueron aprobados por los Comité Ético Científico para el Cuidado de Animales y Ambiente de la Pontificia Universidad Católica de Chile, (ID: 180803006) comprobando que cumple con los principios básicos planteados en la Ley Chilena 20.380 sobre Protección Animal (2009), el Código Sanitario de los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 24ª Edición, 2015), la Directiva Europea 2010/63/UE y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (NRC, 8ª Edición, 2011), documentos a los que adscribe esta institución. El protocolo cumple también con el principio de las 3Rs: Reemplazar, Reducir y Refinar.

#### **3.2 Modelo animal y protocolos de hipoxia crónica intermitente.**

Los experimentos se realizaron en ratas Sprague-Dawley machos de 6 semanas de vida (~200g), alimentadas con dieta estándar y acceso al agua ad libitum. Los animales fueron expuestos a ciclos hipóxicos de 5% O<sub>2</sub> por 20 s, seguidos por 290 s de aire (normóxia), 12 veces por hora por 8 horas/día, desde las 9:00 horas hasta las 17:00 horas por 14, 21 y 28 días. Los niveles de O<sub>2</sub> en las cámaras fueron modificados con un sistema computarizado que controlaba la apertura y cierre de válvulas solenoídes que permiten la entrada de N<sub>2</sub> y su

remoción por ventiladores. Los niveles de O<sub>2</sub> fueron monitoreados por un analizador de oxígeno (Ohmeda 5120, BOC Healthcare, Manchester, RU). (Del Rio *et al.*, 2010, Del Rio *et al.*, 2016, Iturriaga *et al.*, 2014). Los animales fueron pesados diariamente. El porcentaje de ganancia del peso se calculó como el porcentaje de aumento de peso en relación con el peso inicial de cada animal.

### **3.3 Imágenes de resonancia magnética**

Los estudios de Resonancia Magnética (MRI) se realizaron en 3 animales controles y 3 animales expuestos a 28 días de CIH en un resonador preclínico 1.0T Bruker ICON (Bruker BioSpin, Fällanden, Switzerland) con un gradiente de fuerza de 450mT/m y una bobina de micro solenoide. Los animales fueron anestesiados con 5% de isoflurano y mantenidos de 1% a 2% durante todo el protocolo de MRI. La temperatura corporal fue controlada con una bomba de agua caliente (SA Instruments, Stony Brook, NY). La sincronización del ECG se realizó mediante 2 agujas metálicas colocadas por vía subcutánea en las patas delanteras, y se colocó un transductor de presión en el abdomen para la activación respiratoria (SA Instruments). Se usó Cine-FLASH para la adquisición de imágenes temporales del eje cortadas en T1 con resolución temporal del corazón para así derivar parámetros funcionales y volumétricos. Los parámetros de imagen incluyeron el tiempo de repetición (TR) = intervalo RR / número de cuadros (~ 8 a 10 ms), T<sub>Reff</sub> = intervalo RR, tiempo del eco (TE) = 1.0 ms, campo de visión (FOV) = 25x25 mm, tamaño de matriz = 128x128, grosor de corte = 1 mm; Ángulo de inclinación = 40°, 4 promedios, 9 cortes y el número de cuadros por ciclo cardíaco varió entre 10 y 14 para mantener un TR adecuado. El tiempo de adquisición fue de 8 +/- 0.5

min. La adquisición fue en el *peak* del complejo QRS. Los pasos de codificación de fase se distribuyeron por igual a lo largo del ciclo cardíaco para obtener marcos diastólicos y sistólicos para la medición de parámetros funcionales y volumétricos. Las imágenes se analizaron mediante el software OSIRIS X (OSIRIS MD 9.0). Se estimó el volumen de fin de diástole (VFD) y sístole (VFS) midiendo el área interna ventricular de 9 cortes axiales, multiplicando por el largo ventricular. De la misma forma se estimó la fracción de eyección (FE), la cual fue  $(VFS-VFD)/VFD*100$  y el grosor de la pared ventricular en etapa de diástole  $(\text{Endocardio-Pericardio}) * \text{Largo ventricular}$ . Todos los parámetros fueron determinados para los ventrículos derecho e izquierdo. Los análisis fueron realizados por 3 observadores diferentes usando las mismas imágenes, resultando en el promedio de estas mediciones. (Lavin *et al*, 2019).

#### **3.4. Medición de presión sistólica ventricular derecha.**

Finalizado el protocolo de exposición a CIH, los animales se anestesiaron con uretano- $\alpha$ -cloralosa (800-40 mg/kg, respectivamente i.p.). Los animales fueron traqueotomizados, y conectado a un ventilador de ventilación de presión positiva (RoVent Jr, Kent Scientific, Torrington, CT, EE. UU.). Se realizó una toracotomía para exponer el corazón. La presión sistólica ventricular derecha se registró con un catéter heparinizado (500 UI/mL) introducido en el ventrículo derecho, y la frecuencia cardíaca se derivó de la señal de presión arterial que se registró con un transductor Statham P23 (Hato Rey, Puerto Rico, EEUU) conectado a un sistema de adquisición PowerLab (ADInstruments, Castle Hill, Australia) y el software LabChart versión 8 ADInstruments.

### 3.5. Miografía de alambre.

El pulmón izquierdo fue removido y sumergido en una solución de Krebs-Ca<sup>2+</sup> fría (NaCl 118,5mM, NaHCO<sub>3</sub> 0,63M, KCl 3,1M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 60mM, MgSO<sub>4</sub> 60mM, CaCl<sub>2</sub>.0,25M, Glucosa 5,5M). Posteriormente, arterias pulmonares de 2da y 3ra generación (~2-3 por animal de 2 mm de largo, ~400-800 µm de diámetro óptimo) fueron disecadas, aisladas y montadas en un miógrafo de alambre (modelo 620M; Danish Myo Technology A/S, Aarhus, Denmark), mantenidas a 37°C en buffer Krebs-Ca<sup>2+</sup> con constante burbujeo (95% O<sub>2</sub> – 5% CO<sub>2</sub>) (Castillo- Galán *et al.*, 2016). La fuerza isométrica fue registrada usando un sistema de adquisición PowerLab (ADInstruments, Castle Hill, Australia) y el analizada con el software LabChart (versión 8; ADInstruments). El diámetro interno de las arterias fue normalizado mediante la determinación de la relación óptima entre la fuerza contráctil en respuesta a una concentración isotónica de KCl (64,9 mmol/L-1) y el diámetro del vaso (Delaey *et al.*, 2002). Este método permite comparar diferentes vasos mediante la normalización respecto a sus niveles *in vivo* (Mulvany y Aalkjaer, 1990). Las curvas concentración-respuesta (CCR) se construyeron con las respuestas contráctiles inducidas por KCl (16,7 a 125 mM) y endotelina-1 (ET-1; 10<sup>-12</sup> a 10<sup>-6</sup> M).

### 3.6. Extracción de mRNA y qPCR.

Muestras congeladas de pulmón izquierdo (~100 mg) fueron homogenizados en TRIzol (Thermo Fisher, Waltham, MA, EE. UU) y luego centrifugadas a 12000 g. El RNA (sobrenadante) se resuspendió en agua libre de nucleasas (20 µl) para luego determinar su

concentración y pureza mediante espectrofotometría. La razón 260/280 de todas las muestras fue de 1,9-2,05. El RNA fue guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior uso. La síntesis a cDNA se realizó usando el kit cDNA Synthesis Kit (ABM, Richmond, Canada). La expresión génica de TRPC1, TRPC4, TRPC6, ORAI1, ORAI2 y 18S fue determinada mediante PCR en tiempo real (qPCR) en un equipo StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), usando kit KicqStart (Sigma-Aldrich) (Tabla 1). Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La génica expresión relativa fue calculada usando el método de  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . El grupo control fue usado como referencia y el gen 18S fue utilizado como normalizador.

Tabla 2. Secuencia y características de los partidores usados en el análisis.

Gen	F/R	Secuencia del partidor (5'-3')	T <sub>m</sub> (°C)	Tamaño amplicón (bp)	Tiempo de Extensión (s)
TRPC1	For	5'-AGTTCCTGAACACCGTTTGG-3'	60°	164 bp	10 s
	Rev	5'-CGGTGTGTGAATGATTCTGC-3'			
TRPC4	For	5'-CAGGCTGGAGGAGAAGACAC-3'	60°	195 bp	10 s
	Rev	5'-AGGCTAGCAGCAGCAGAAAC-3'			
TRPC6	For	5'-TCTGGCTGCTCATTGCCAGGAATA-3'	60°	323 bp	30 s
	Rev	5'-AGAGTGGCTGAAGGAGTCATGCTT-3'			
ORAI1	For	5'-CGCCCTCATGATCAGTACCT-3'	60°	191 bp	10 s
	Rev	5'-AGAACTTCACCCAGCAGAGC-3'			
ORAI2	For	5'-GTGGGTCTCATCTTCGTGGT-3'	62°	142 bp	10 s
	Rev	5'-CCACCTGTAGGCTTCTCTCG-3'			
18S	For	5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'	58°	152 bp	10 s
	Rev	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'			

### 3.7. Western Blotting.

Para la obtención de proteínas totales de pulmón, muestras congeladas de pulmón izquierdo (~200 mg) fueron homogenizadas mecánicamente en buffer de lisis RIPA (Thermo Fisher)

suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Pierce™, Thermo Fisher). Las concentraciones de proteínas se calcularon usando el kit DC Protein Assay (Bio-Rad Hercules, CA, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas aisladas fueron guardadas a -80°C hasta su uso. 10 ug de proteínas fueron resultas en un gel SDS-PAGE (10-12%). Luego, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Posterior a un apropiado bloqueo (Leche descremada en polvo Soprole 5% en PBS 1X) las membranas se incubaron con anticuerpos específicos contra TRPC1 (Santa Cruz, Dallas, TX,USA, sc-133076), TRPC6 (Santa Cruz, sc-515837), STIM1 (Santa Cruz, sc-166840), ORAI2 (Santa Cruz, sc-376757), and ORAI1 (Santa Cruz, sc-377281), disueltos 1:1000 en leche descremada en polvo 5% toda la noche en agitación constante a 4°C. Posteriormente a tres lavados (tween20 0,1% en PBS 1X) las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario anti-mouse conjugado a HRP (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) en una dilución de 1:5000 en leche en polvo descremada al 5%. Los niveles de proteínas fueron normalizados contra los niveles de  $\beta$ -actina (Sigma-Aldrich, AC-74) que contenía cada muestra. Las señales obtenidas fueron escaneadas mediante un sistema de detección de quimioluminiscencia Odyssey Imaging System LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, EE. UU) para luego ser cuantificadas con el software Image J (NIH, Bethesda, MD, EE.UU).

### **3.8. Marcadores de estrés oxidativo.**

Como marcadores de estrés oxidativo se determinó la concentración de ácido malonaldehído (MDA) y de 3-Nitrotirosina (3-NT). La concentración de MDA se midió en plasma y en pulmón. mediante un kit de inmunoensayo enzimático específico (EIA, TBARS) (Cayman

Chemical, Ann Arbor, MI) (Xu *et al.* 2011) y la detección de nitración protéica se determinó mediante dot blot contra 3-NT (sc-4942), tanto en macerado de pulmón como a nivel plasmático.

### **3.9. Medición del remodelamiento vascular y de colágeno.**

Muestras de 2 cm de grosor del tercio inferior del pulmón derecho, se fijaron por inmersión en Paraformaldehído 4%, se incluyeron en bloques de parafina, se cortaron en láminas de 3 - 5  $\mu\text{m}$  de espesor y se montaron en portaobjetos. Para los análisis morfológicos, los cortes montados en portaobjetos fueron desparafinados, deshidratados y sometidos a tinción de Van Gieson para estudiar la morfología y picrosirius red para determinar colágeno. Brevemente, se diluyó 0,5 mg de Direct red 80 (Sirius red, Sigma-Aldrich) en 500 ml de una solución saturada de ácido pícrico. Luego, los cortes montados en portaobjetos, fueron teñidos por 1 hora en la solución de picrosirius red. Posterior a esto, los cortes fueron deshidratados y montados con medio Entellan (Sigma-Aldrich). Para la adquisición de las imágenes teñidas con Van Gieson, se utilizó un microscopio trinocular (Olympus BX41) equipado con una cámara digital (Jenoptik Progres C3), Se adquirieron 10-15 imágenes de arterias pulmonares de ~150 – 300 y de 300-800  $\mu\text{m}$  de diámetro por pulmón por cada animal. El área de la capa muscular de la pared arterial se midió mediante el Software *Image Pro6.3*. El porcentaje de capa muscular se midió mediante la siguiente fórmula:  $(\text{área muscular} - \text{área del lumen}) / \text{área muscular} * 100$ , según (Herrera *et al.*, 2010, Castillo-Galán *et al.*, 2020).

Para la adquisición de imágenes teñidas con picrosirius red, se utilizó un microscopio Nikon Eclipse Ti2-E (invertido) (Nikon, Tokyo, Japón), usando el programa NIS-Elements Viewer

5.21 (Nikon, Tokyo, Japón). Para calcular el colágeno perivascular se adquirieron 10-15 imágenes, a 40X utilizando opción “Bright Field”, de arterias pulmonares de ~150 – 300  $\mu\text{m}$  de diámetro por pulmón por cada animal. El porcentaje de colágeno perivascular se calculó como (área total- área adventicia) / área total \*100. Para la determinación de colágeno total se adquirieron 100 imágenes consecutivas (10 \* 10) con un aumento del 20X, reconstruyendo así el corte de pulmón completo montado en el portaobjeto, por cada animal. El colágeno total se midió mediante el recuento de píxeles por área.

### **3.10. Superficie luminal vascular y densidad vascular.**

En cortes histológicos de pulmón teñidos con Van Gieson, se capturaron 6 imágenes con un aumento de 10X reconstruyendo así un área de 6  $\text{cm}^2$ . Posteriormente se determinó la superficie vascular luminal (área luminal/área total) y la densidad vascular (número de arterias /área total).

### **3.11. Inmunohistoquímica.**

La detección inmunohistoquímica contra  $\alpha$ -actina y Ki-67 ( $\alpha$ -actin-ir y Ki-67-ir) se realizó con el anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -actina de músculo liso (Clon RM253, Sigma-Aldrich, Misuri, EE. UU., dilución: 1: 400) y el anticuerpo anti-Ki-67 (clon MIB-1, Dako, Glostrup, Dinamarca, dilución 1: 100). Para todos los procedimientos, la recuperación del antigénica se realizó a 100 °C con tampón de citrato a pH 6,0. Las incubaciones de anticuerpos primarios se realizaron durante la noche a 4 ° C en una cámara húmeda. Para el revelado se utilizó un kit de

HRP-diaminobencidina (Envision, Dako, CA, EE. UU.). Las imágenes del tejido pulmonar se adquirieron digitalmente a 40X. La inmunorreactividad a  $\alpha$ -actina en la capa muscular de las pequeñas arterias pulmonares se midió como de píxeles por área. El porcentaje de núcleos positivos para Ki-67-ir en la capa medial de PASMC se calculó como el porcentaje de núcleos positivos para Ki-67 en relación a los nucleos totales (Castillo-Galán et al., 2016).

### **3.12. Infusión de 2-APB.**

Para determinar el efecto de la inhibición de los STOC, se expusieron ratas a 14 días de CIH, y bajo los efectos de isoflurano 2%, en O<sub>2</sub> se les implantó subcutáneamente bombas osmóticas (2ML4, Alzet Scientific Products, Chevy Chase, MD, EE.UU). A un grupo de ratas se les implantó bombas osmóticas cargadas con 2-APB, una droga con acción inhibitoria sobre SOCE, la cual liberó 2-APB a una tasa de: ~10 mg/kg/día (n=8). Otro grupo de ratas se implantaron con bombas osmóticas conteniendo solo el vehículo (DMSO:ETOH:Salina 1:5:4) (n=7). Luego de la cirugía ambos grupos experimentales volvieron a ser expuestos a CIH por 14 días, completando los 28 días de CIH.

### **3.13. Infusión de Tempol.**

Para determinar el efecto del 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidin-1-oxilo (Tempol), un mimético de la SOD, sobre el estrés oxidativo, la expresión de STOC inducida por CIH, se expusieron 12 ratas a 14 días de CIH. Posterior a esta exposición, las ratas se separaron de forma aleatoria en 2 grupos experimentales. Las ratas se anestesiaron con isoflurano 2% y se

les implantó subcutáneamente en la espalda bombas osmóticas (2ML4, Alzet Scientific Products, Chevy Chase, MD, E.E. U.U.) cargadas con Tempol (~30 mg/kg/día) (n=8), o con el vehículo de Tempol (Salino 0,9%) (n=7). Luego de la cirugía, ambos grupos experimentales volvieron a ser expuestos a CIH por 14 días, completando los 28 días de CIH.

### **3.14. Análisis Bioinformático.**

Debido a la información limitada sobre los efectos de CIH en las vías moleculares subyacentes a la remodelación vascular y la hipertensión arterial en el tejido pulmonar, realizamos un análisis bioinformático usando la base Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Entre todos los datos incluidos en esta base GEO, solo hay un conjunto de datos (GSE8705) que se pueden seleccionar usando tres criterios de búsqueda de nuestro interés: “hipoxia crónica intermitente”, “hipoxia sostenida” y “pulmón”. Estos datos experimentales corresponden al trabajo de Wu *et al.*, 2008 donde se obtuvieron perfiles de expresión génica a lo largo del tiempo a partir de tejidos pulmonares para estudiar diferentes mecanismos involucrados en las respuestas pulmonares a hipoxia intermitente crónica y sostenida sobre el aumento de las actividades de los receptores de hormonas esteroideas, transporte de iones, neuronales y esteroides acoplados a proteína G. Brevemente, ratas macho Sprague-Dawley se expusieron a CIH (ciclos de 90 s de O<sub>2</sub> al 10% seguidos de 90 s de O<sub>2</sub> al 21% durante 12 horas) o hipoxia sostenida (SH) (O<sub>2</sub> al 10%), como grupo control usaron ratas expuestas al aire. Entre los diferentes protocolos usados por los autores, elegimos tres grupos de ratas: 14 días de CIH, 14 días de SH y ratas controles. Evaluamos en este conjunto de datos, los factores involucrados en la expresión de STOC y contrastamos la

expresión genética diferencial y los procesos biológicos inducidos por CIH e hipoxia sostenida. La lista de interés basada en los genes que modulan la expresión del gen STOC se analizó con el programa DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) (Jiao *et al.*, 2013) y la anotación en Biological Processes (BP). El cribado de la expresión génica diferencial (DEG) se realizó con la herramienta GEO2R (Clough y Barrett, 2016). Debido al escaso número de muestras disponibles para el análisis,  $|\logFC| > 0,5$  y el valor p-ajustado de la Tasa de Descubrimiento Falso (FDR) de 0,05 se establecieron para identificar genes expresados diferencialmente con respecto a los controles.

### **3.15. Análisis estadísticos.**

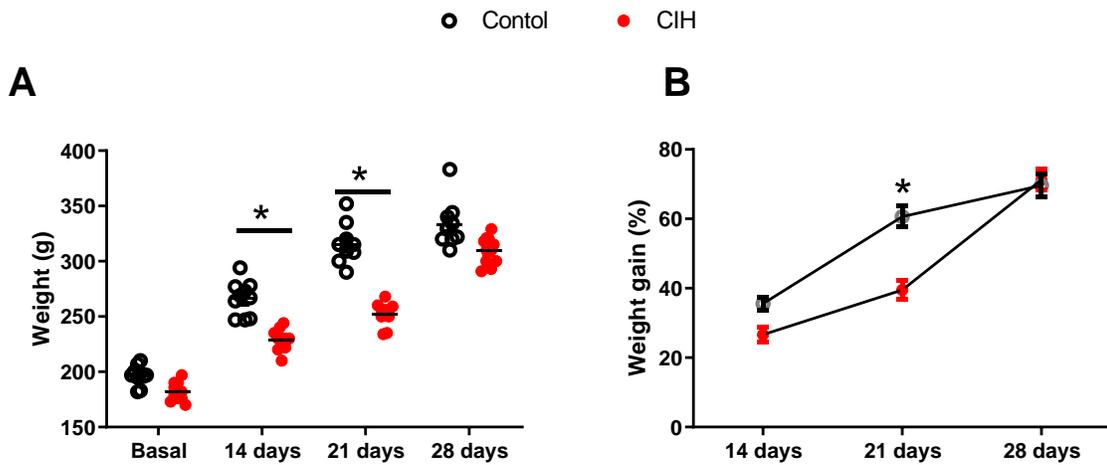
Los datos se expresaron como promedio  $\pm$  error estándar ( $\pm$  ESM.). Para los análisis de resonancia magnética se utilizó un *test* Mann-Whitney, y para los análisis de expresión génica se utilizaron ANOVA de una o dos vías y post *test de* Newman-Keuls para comparaciones múltiples. En el caso de análisis porcentual, se efectuó la conversión arcoseno para normalizar los datos. Para el análisis de correlación se usó el test de correlación de Pearson. Todos los resultados fueron analizados y graficados en el software GraphPad Prism6.01 (GraphPad Software Inc., SanDiego, CA, EE.UU). Para todas las comparaciones, se consideraron las diferencias como estadísticamente significativas cuando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Curso temporal de los efectos de CIH sobre la presión ventricular derecha, el remodelamiento vascular pulmonar, disfunción cardiopulmonar, y los niveles génicos y proteicos de STOC a nivel pulmonar

#### 4.1.1 Efectos de la exposición a CIH sobre a ganancia de peso de los animales.

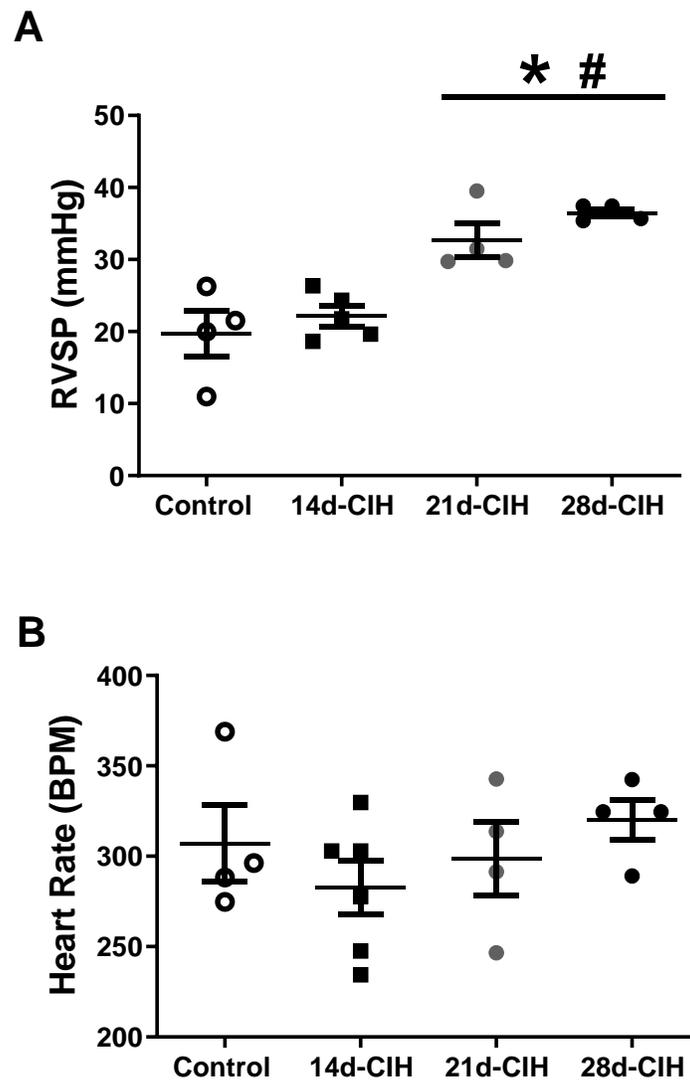
Se comparó el efecto de la CIH sobre la ganancia de peso en los animales durante los experimentos. Al inicio, los animales presentaron un peso similar ( $182.0 \pm 2.8$  g vs.  $170 \pm 2.4$  g , para Controles vs. CIH, respectivamente). A los 14 días el peso fue de  $247.0 \pm 5.4$  g vs.  $210.0 \pm 2.8$  g, para Controles vs. CIH. A los 21 días fue de  $290.0 \pm 5.5$ g vs.  $234.0 \pm 3.1$ g, para Controles vs. CIH. Por lo tanto, el peso en los animales sometidos a CIH a los 21 días fue más bajo con relación a los animales normóxicos. Sin embargo, a los 28 días esta diferencia no fue significativa ( $310.0 \pm 6.4$ g vs.  $298.0 \pm 3.7$ g, para Controles vs CIH) (Figura 3A). En relación a la ganancia de peso porcentual, se observa una disminución significativa en la ganancia de peso a los 21 días en relación a los animales normóxicos. Sin embargo, a los 28 días, los animales expuestos a CIH presentaron una ganancia de peso similar a los animales Controles (Figura 3B).



**Figura. 3. Efecto de la hipoxia intermitente crónica (CIH) sobre la ganancia de peso durante el experimento.** A, Peso y B, ganancia porcentual de peso al comienzo del experimento y a los 14, 21 y 28 días en Controles normóxicos (círculos vacíos, n=10) y en animales expuestos a CIH (círculos rojos, n=11). La ganancia porcentual de peso se calculó en relación al peso inicial de cada animal. Valores promedio  $\pm$  E.S.M. \* P < 0,05 vs. Normóxia en el mismo día. ANOVA de dos vías, seguida por -Newman Keuls.

#### **4.1.2 Efectos de la exposición a CIH sobre la presión sistólica ventricular derecha y la frecuencia cardíaca.**

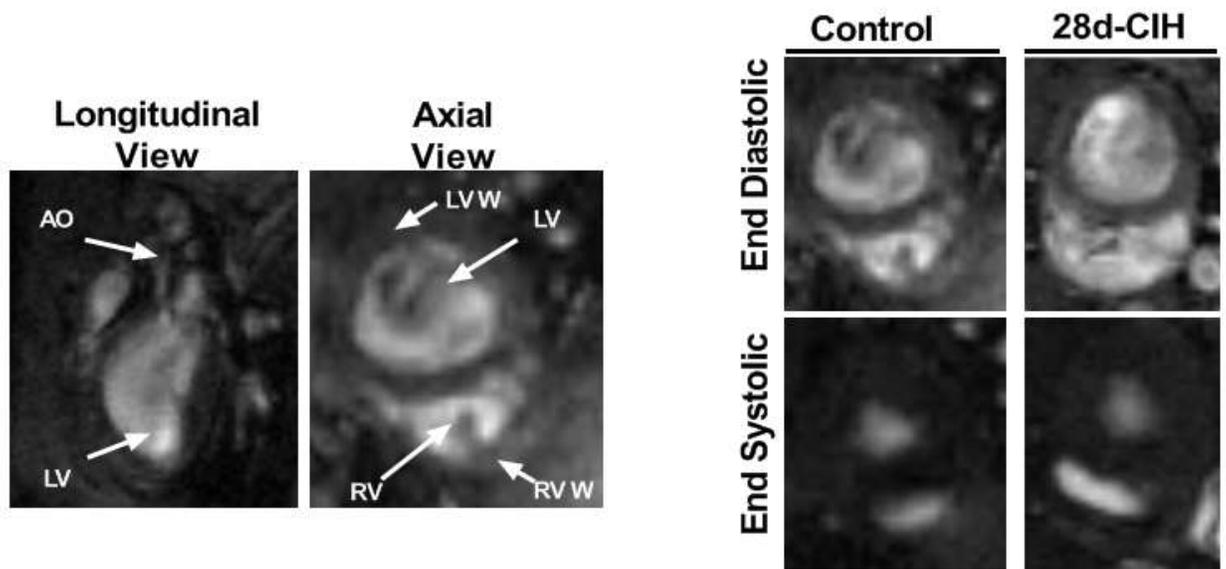
La presión sistólica ventricular derecha (RVSP) y la frecuencia cardíaca (HR) fueron medidas 24 h después de la última exposición a hipoxia en cada grupo experimental. La RVSP fue significativamente mayor en animales expuestos a 21 días ( $32,6 \pm 2,3$  mmHg) y 28 días ( $36,5 \pm 0,5$  mmHg) días en comparación a animales expuestos a 14 días ( $22,1 \pm 1,4$  mmHg) a CIH y a sus respectivos controles ( $19,7 \pm 3,2$  mmHg) (Figura 4A). La frecuencia cardíaca no presentó cambios tanto en los grupos expuestos a CIH como en los animales controles (Figura 4B).



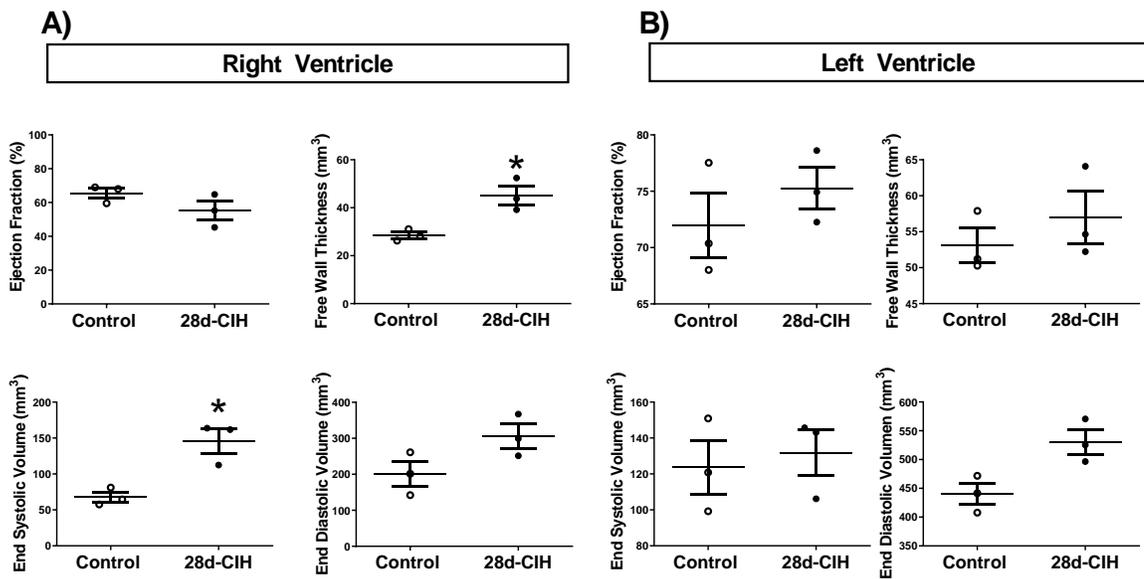
**Figura. 4. Efecto de la hipoxia intermitente crónica (CIH) sobre la presión sistólica ventricular derecha y la frecuencia cardiaca en ratas.** (A) Presión sistólica ventricular derecha (RVSP) y (B) frecuencia cardiaca (Heart Rate) en animales controles (círculos vacíos, n=4) y animales expuestos a 14d-CIH (cuadrados negros, n=5), 21d-CIH (círculos grises, n=4) y 28d-CIH (círculos negros, n=4). Valores promedio  $\pm$  E.S.M. \* P<0,05 vs. Control, # P<0,05 vs. 14d-CIH. ANOVA de una vía, seguida por -Newman Keuls.

#### **4.1.3 Efectos de la exposición a CIH en la función cardiaca.**

La función ventricular derecha *in vivo* de ratas expuestas a 28 días de CIH se determinó mediante resonancia magnética (MRI) en cortes axiales y longitudinales del corazón (Figura 5). Animales expuestos a 28 días de CIH y presentaron un mayor grosor ventricular derecho y un mayor volumen de fin de sístole en relación a animales controles, sin cambios en el volumen de fin de diástole y en la fracción de eyección derecha (Figura 6A). Estos parámetros se mantuvieron sin cambios a nivel ventricular izquierdo (Figura 6B).



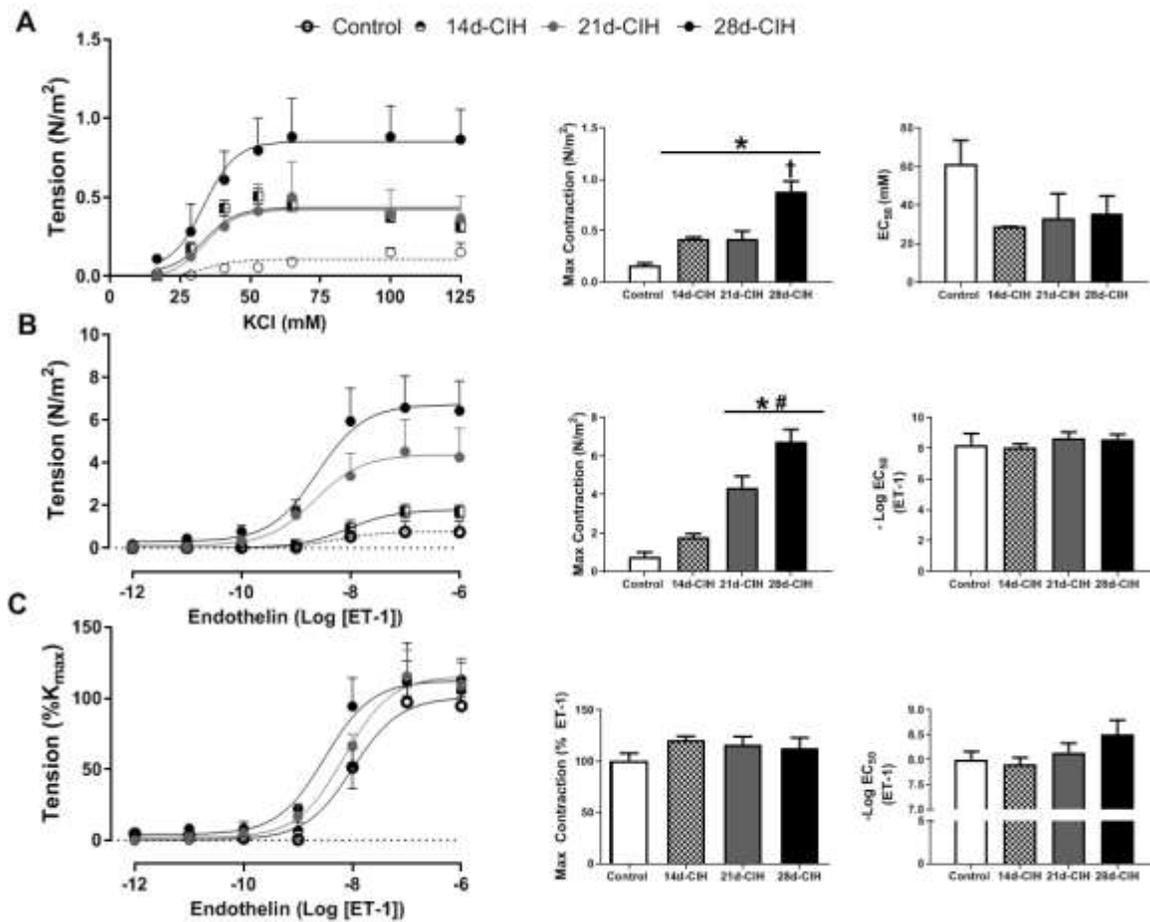
**Figura 5. Imágenes axiales y longitudinales de corazón en resonancia magnética.** (A) panel izquierdo: imagen representativa de vista axial y longitudinal del corazón en la resonancia magnética. Panel derecho: Imagen representativa de la vista axial de los ventrículos en fin de sístole y fin de diástole.



**Figura 6. Efecto de la exposición a CIH sobre la función cardiaca.** Valores calculadores de la fracción de eyección (%), grosor ventricular, volumen de fin de sístole y de fin de sístole en (B) ventrículo derecho y (C) ventrículo izquierdo en animales controles (círculos vacíos, n=3) y animales expuestos a 28 días de CIH (28d-CIH) (círculos negros, n=3). **Fracción de eyección:** (Volumen de fin de diástole-volumen de fin de sístole)/volumen de fin de diástole\*100; **Grosor ventricular:** (área del pericardio – área del endocardio)\* largo ventricular. **Volumen de fin de diástole o sístole:** (área de fin de diástole o sístole \* largo ventricular) AO: Aorta, LV: Ventrículo izquierdo, RV: ventrículo derecho, LVW: pared del ventrículo izquierdo, RVW: pared del ventrículo derecho. Valores expresados como media ± E.S.M. \*: P<0, 05 vs. control, Mann-Whitney.

#### **4.1.4 Efectos de CIH sobre la función vaso contráctil en arterias pulmonares aisladas.**

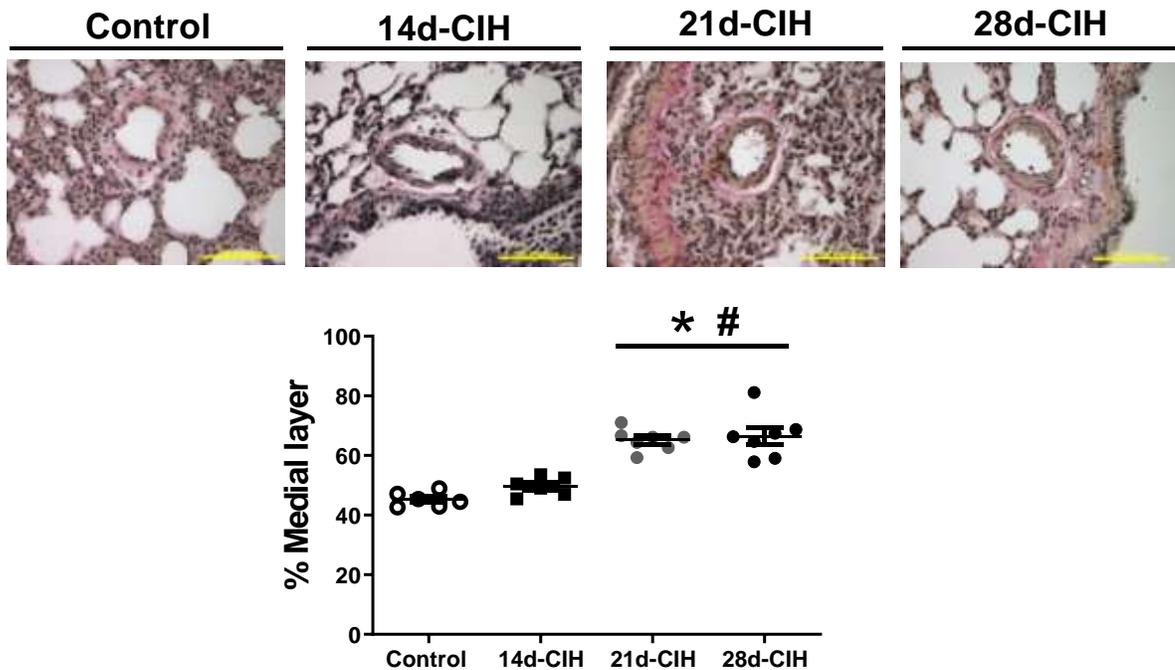
Arterias pulmonares de 400-800  $\mu\text{m}$  de diámetro, aisladas de ratas expuestas a CIH por 14, 21 y 28 días presentaron una mayor contracción máxima en respuesta a concentraciones crecientes de KCl, junto a un menor  $\text{EC}_{50}$  comparado al grupo control (Figura 7). En relación con valores absolutos, arterias pulmonares de animales expuestos a CIH por 21 y 28 días presentaron un aumento en la contracción máxima a ET-1 de ~6-7 veces respectivamente con relación al control, sin cambios en  $\text{pD}_2$  en relación a arterias pulmonares de animales expuestos a 14d-CIH y a animales controles (Figura 7B). Por el contrario, las arterias pulmonares no presentaron cambios en respuesta a concentraciones crecientes de ET-1 cuando estas se normalizaron en relación a KCl max., presentando similares valores de contracción máxima y  $\text{pD}_2$  (Figura 7C).



**Figura 7. Función vasoconstrictora de arterias pulmonares pequeñas aisladas a concentraciones crecientes de KCl y ET-1.** Arterias pulmonares (400-800  $\mu\text{m}$ ) aisladas de animales expuestos a 14, 21 o 28 días de CIH fueron estimuladas por a concentraciones crecientes de KCl (A), endotelina-1 (B) y endotelina-1 con relación a la concentración sub máxima de KCl (C) en controles (círculos vacíos, n=4), 14d-CIH (cuadrados negros, n=4), 21d-CIH (círculos grises, n=5) y 28d-CIH (círculos negros, n=5). La contracción máxima y potencia (pD<sub>2</sub>) fueron calculadas para todas las curvas. Valores expresados como promedio  $\pm$  E.S.M. \* P<0, 05 vs. Control, # P<0, 05 vs. 14d-CIH. † vs. todos los grupos. ANOVA de una vía-seguido por Newman Keuls

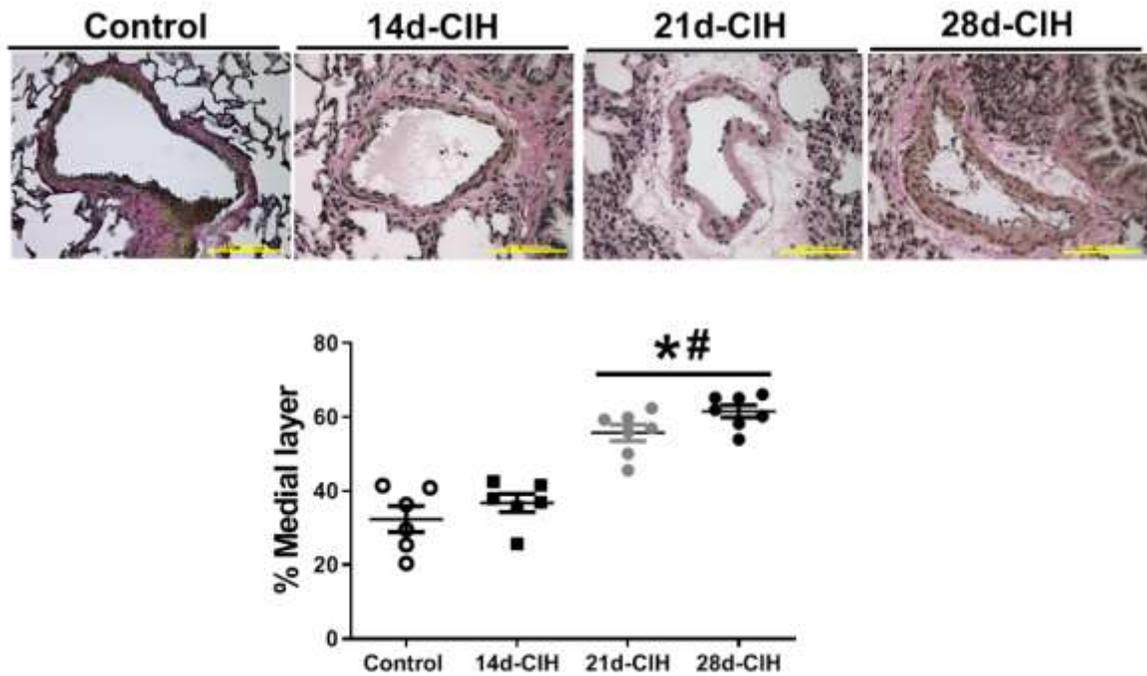
#### **4.1.5. Remodelamiento vascular pulmonar en ratas expuestas a diferentes periodos de CIH.**

Las figuras 8 y 9 resumen el incremento del porcentaje de la capa media de pequeñas arterias pulmonares (150-300  $\mu\text{m}$ ) y arterias pulmonares de mayor calibre (300-800  $\mu\text{m}$ ) inducido por exposición a CIH. Respecto a las arterias de 150- 300  $\mu\text{m}$ , el incremento de la capa media fue significativo a partir de los 21 días de exposición a CIH ( $66,16 \pm 2,44$  %) y permaneció elevada a los 28 días de CIH ( $64,71 \pm 4,20$  %) con relación a las ratas expuestas a 14 días de CIH ( $50,76 \pm 1,53$  %) y a las ratas controles ( $45,02 \pm 1,58$  %) (Figura 8). De manera similar, el incremento de la capa media en arterias pulmonares de mayor calibre (300-800  $\mu\text{m}$ ) fue significativo a partir de los 21 días de exposición a CIH ( $65,18 \pm 1,38$  %) y permaneció elevada a los 28 días de CIH ( $66,46 \pm 2,90$  %) en relación con las ratas expuestas a 14 días de CIH ( $49,65 \pm 1,82$  %) y a las ratas controles ( $45,24 \pm 1,10$  %) (Figura 9).



**Figura 8. Efecto de a CIH sobre el remodelamiento vascular en arterias pulmonares de 150-300  $\mu\text{m}$  de diámetro.**

Cuadro superior: Imágenes representativas de arterias pulmonares de 150-300  $\mu\text{m}$  de diámetro teñidas con Van Gieson. Cuantificación del porcentaje de capa media de pequeñas arterias pulmonares de animales controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), 21d-CIH (círculos grises, n=7) y 28d-CIH (círculos negros, n=7). La capa media se calculó como:  $(\text{área muscular} - \text{área del lumen}) / (\text{área muscular} * 100)$ . Barra =100  $\mu\text{m}$ , valores promedio  $\pm$  E.S.M. \* P<0, 05 vs. Control, # P<0, 05 vs. 14d-CIH. ANOVA de una vía-seguido por Newman Keuls

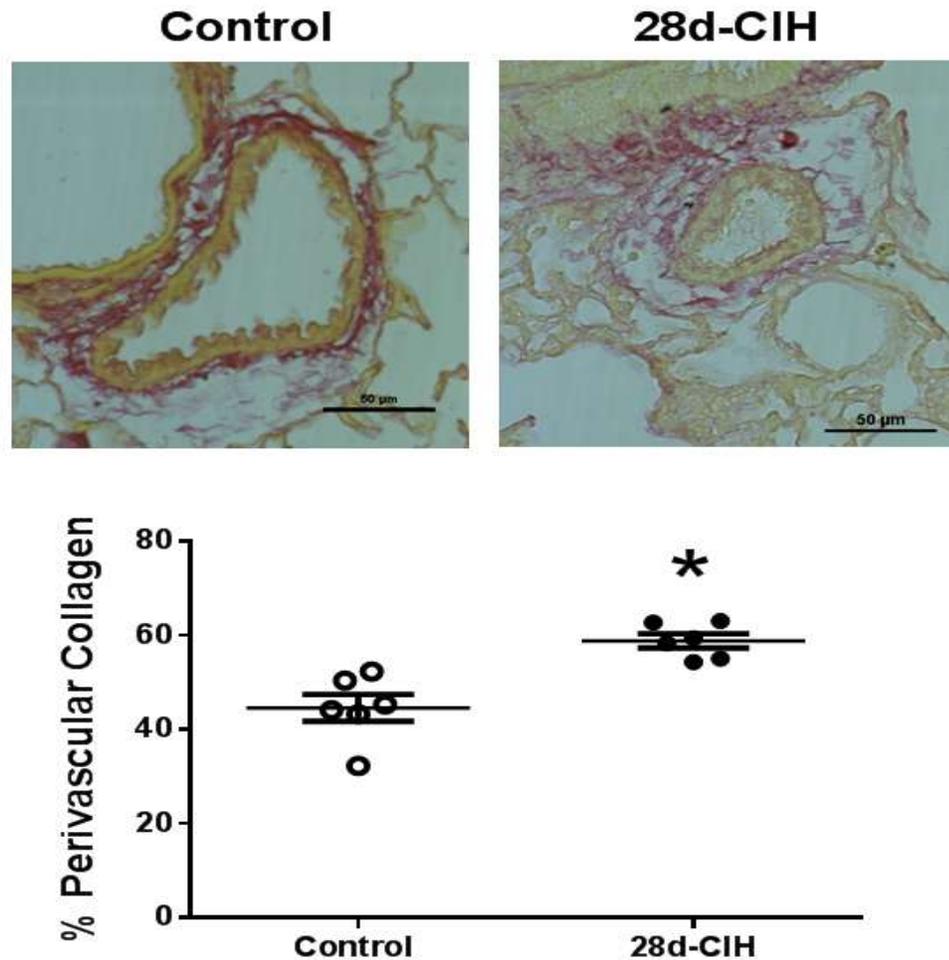


**Figura 9. Efecto de a CIH sobre el remodelamiento vascular en arterias pulmonares de 300-800  $\mu\text{m}$  de diámetro.**

Cuadro superior: Imágenes representativas de arterias pulmonares de 300-800  $\mu\text{m}$  teñidas con Van Gieson. Cuantificación del porcentaje de capa media de pequeñas arterias pulmonares de animales controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), 21d-CIH (círculos grises, n=7) y 28d-CIH (círculos negros, n=7). La capa media se calculó como: (área muscular – área del lumen) / (área muscular \* 100). Barra =100  $\mu\text{m}$ , Valores promedio  $\pm$  E.S.M. \* P<0, 05 vs. Control, # P<0, 05 vs. 14d-CIH. ANOVA de una vía-seguido por Newman Keuls.

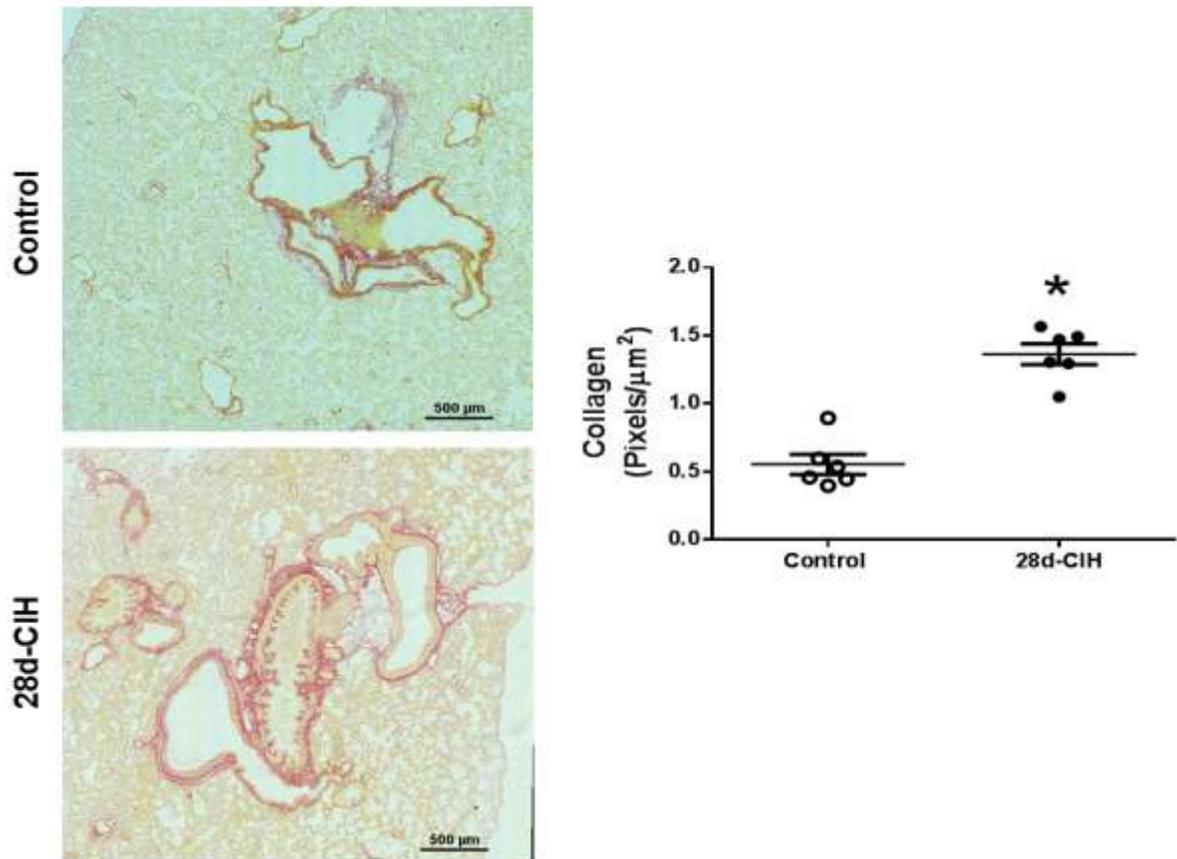
#### **4.1.6. Colágeno total pulmonar y colágeno perivascular en arterias de 150-300 $\mu\text{m}$ de diámetro.**

Las figuras 10 y 11 resumen el incremento del porcentaje de colágeno perivascular presente en pequeñas arterias pulmonares (150-300  $\mu\text{m}$ ) y a nivel pulmonar total. Respecto a las arterias de 150- 300  $\mu\text{m}$ , la exposición a 28 días de CIH indujo un incremento en el colágeno perivascular en relación al control ( $44,66\% \pm 2,87$  vs.  $58,86\% \pm 1,51$ , para control y 28d-CIH, respectivamente) (Figura 10). De manera similar, la exposición a 28 días de CIH incrementó el colágeno total pulmonar en relación al control ( $0,55 \pm 0,07$  vs.  $1,33 \pm 0,08$  pixeles/ $\mu\text{m}^2$ , para control y 28d-CIH, respectivamente) (Figura 11).



**Figura 10.** Efecto de a CIH sobre el colágeno perivascular arterias pulmonares de 150-300  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Panel superior: Imágenes representativas de arterias pulmonares de 150-300  $\mu\text{m}$  teñidas con Picrosirius Red. Cuantificación del porcentaje del colágeno perivascular de pequeñas arterias pulmonares de animales controles (círculos vacíos, n=6) y 28d-CIH (círculos negros, n=7). El porcentaje de colágeno perivascular se calculó como (área total- área adventicia) / área total \*100. Barra =50  $\mu\text{m}$ , Valores promedio  $\pm$  E.S.M. \* P<0,05 vs. Control. T test.



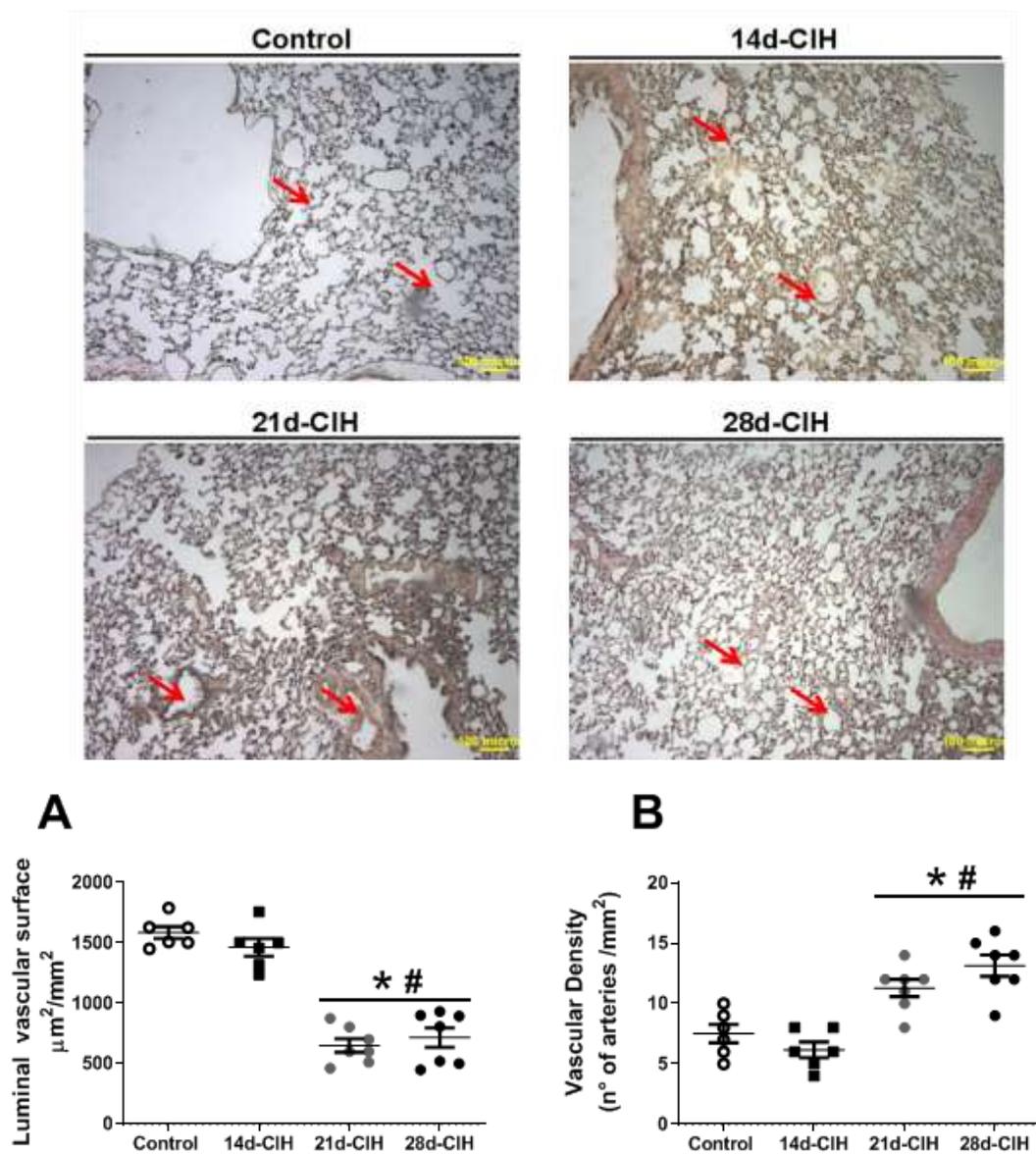
**Figura 11. Efecto de la CIH sobre el colágeno total pulmonar.**

Cuantificación del colágeno en cortes de pulmones de ratas controles (círculos vacíos, n=6), y 28d-CIH (círculos negros, n=6). Barra =500 μm. Aumento: 1X, Valores promedio ± E.S.M.

\* P<0,05 vs. Control. T-Test.

#### **4.1.7. Densidad vascular y superficie luminal en pulmones de ratas expuestas a diferentes periodos de CIH.**

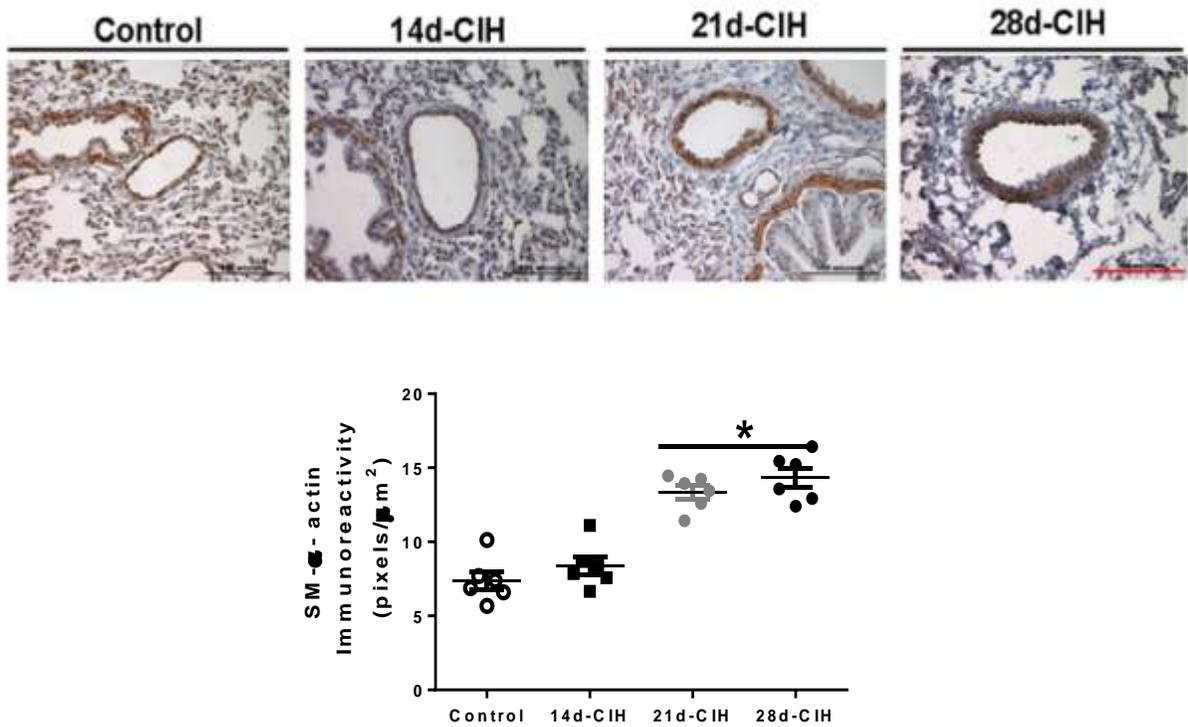
El análisis de densidad vascular del pulmón mostró un aumento en el número de arterias de resistencia (150-300  $\mu\text{m}$ ) por aérea en los animales expuestos a 21 y 28 días de CIH ( $11,80 \pm 1,28$  vs.  $12,73 \pm 0,75$  arterias/ $\text{mm}^2$ , para 21 y 28 días, respectivamente) en relación a los animales expuestos por 14 días a CIH y controles ( $7,00 \pm 1,00$  vs.  $7,22 \pm 0,62$  arterias/ $\text{mm}^2$ , para 14d-CIH y controles, respectivamente) (Figura 12 A). Por el contrario, los animales expuestos a 21 y 28 días a CIH presentaron una menor superficie luminal vascular ( $651,00 \pm 81,16$  y  $798,80 \pm 71,71$   $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ , para 21 y 28 días CIH, respectivamente) en relación a los animales expuestos a 14 días y controles días a CIH ( $1478,00 \pm 360,10$  y  $1491,00 \pm 72,70$   $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ , para 14 días y controles respectivamente) (Figura 12B).



**Figura 12. Efecto de a CIH sobre la densidad vascular y superficie luminal en pulmones de ratas.** Cuadro superior: Parénquima pulmonar de teñidas con Van Gieson. Cuantificación de la superficie vascular luminal (A) y densidad vascular (B) en animales controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), 21d-CIH (círculos grises, n=7) y 28d-CIH (círculos negros, n=7). Barra =100  $\mu\text{m}$ , Valores promedio  $\pm$  E.S.M. \*  $P < 0,05$  vs. Control, #  $P < 0,05$  vs. 14d-CIH. ANOVA de una vía-seguido por Newman Keuls.

#### **4.1.8. La exposición a CIH induce un aumento progresivo en la inmunorreactividad a $\alpha$ -actina en arterias pulmonares de ratas.**

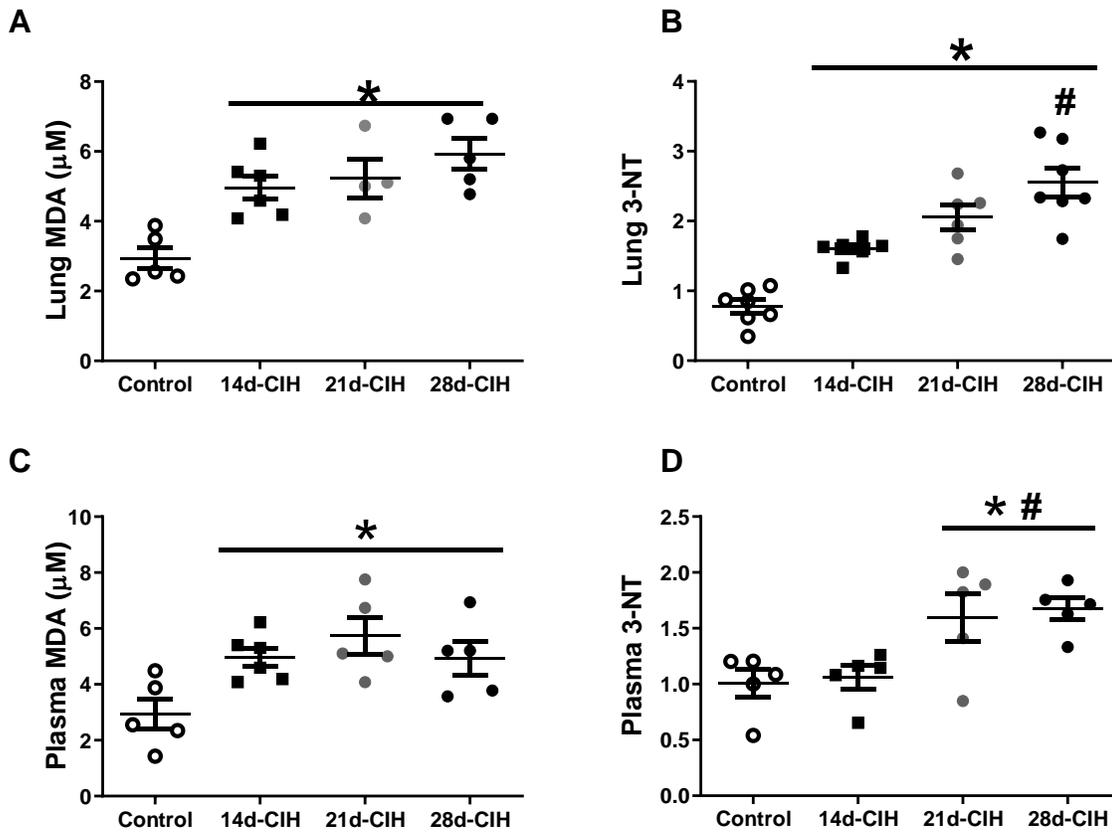
La exposición a CIH induce un incremento progresivo en la inmunorreactividad a  $\alpha$ -actina en arterias pulmonares de ratas, la cual es significativa a partir de los 21 días ( $7,38 \pm 0,62$  vs.  $8,38 \pm 0,62$  vs.  $13,35 \pm 0,47$  vs.  $14,33 \pm 0,65$  pixeles/ $\mu\text{m}^2$  para controles, 14d-CIH, 21d-CIH y 28d-CIH, respectivamente) (Figura 13).



**Figura 13. Efecto de a CIH sobre la inmunorreactividad a  $\alpha$ -actina en arterias pulmonares de ratas.** Cuantificación de la inmunorreactividad a  $\alpha$ -actina en arterias pulmonares de ratas controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), 21d-CIH (círculos grises, n=7) y 28d-CIH (círculos negros, n=7). Barra =100  $\mu\text{m}$ . Aumento: 40X, Valores promedio  $\pm$  E.S.M. \* P<0,05 vs. Control, # P<0,05 vs. 14d-CIH. ANOVA de una vía-seguido por Newman Keuls.

#### **4.1.9. Estrés oxidativo sistémico y pulmonar en ratas expuestas a diferentes periodos de CIH.**

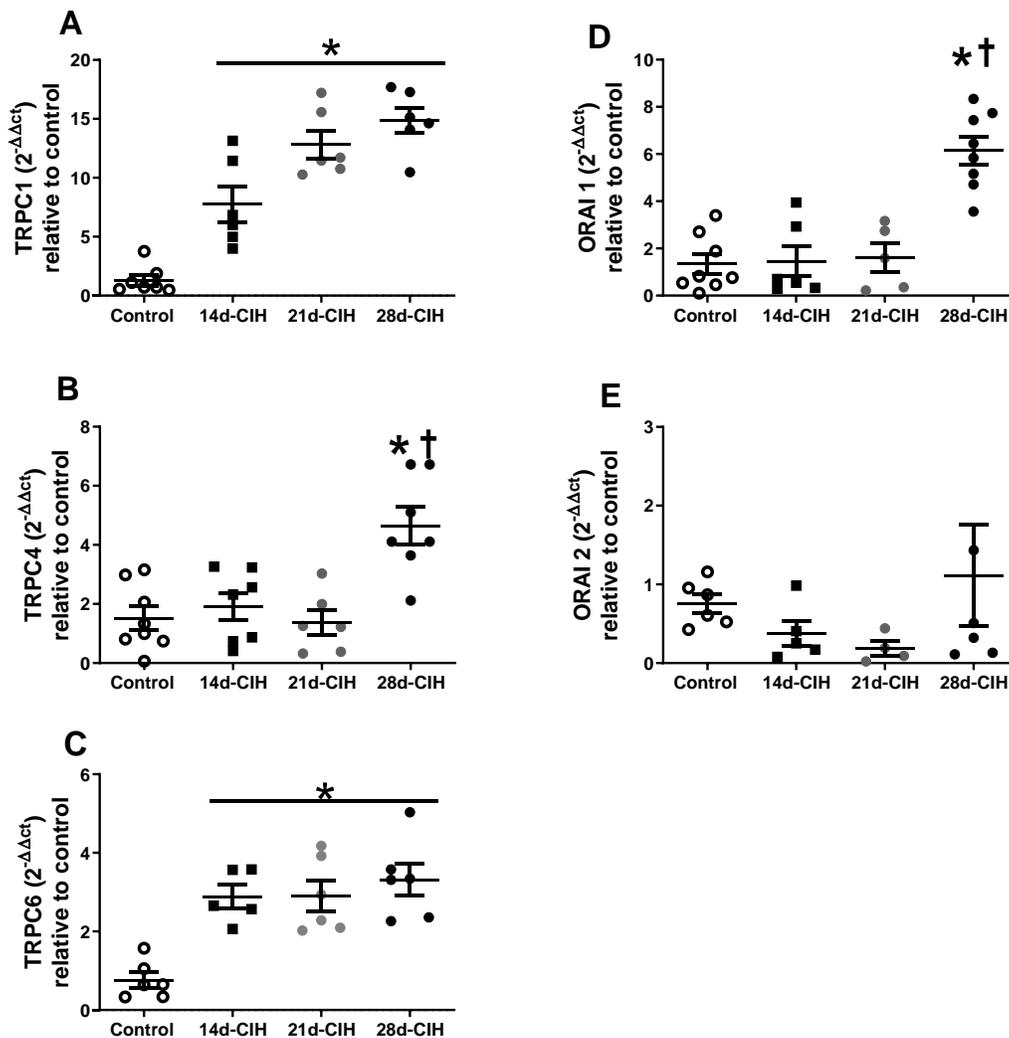
Ratas expuestas a 14, 21 y 28 días de CIH presentaron una mayor concentración de MDA tanto a nivel pulmonar como a nivel plasmático en relación a animales controles (Figura 14A y C). De similar manera, animales expuestos a CIH presentaron elevados niveles de 3-NT a nivel pulmonar en relación a animales controles (Figura 13B), los niveles de 3-NT solo fueron mayores a nivel sérico en animales expuestos a 21 y 28 días a hipoxia (Figura 14D).



**Figura 14. Estrés oxidativo sistémico y pulmonar producido por CIH.** Se midió en plasma y macerado de pulmón la concentración de MDA (A y C) y los niveles de 3-NT (B y D) en animales controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), 21d-CIH (círculos grises, n=6) y 28d-CIH (círculos negros, n=7). Valores promedio  $\pm$  E.S.M. \*  $P < 0,05$  vs. Control, #  $P < 0,05$  vs. 14d-CIH. ANOVA de una vía-seguido por Newman Keuls.

#### **4.1.10. Cambios de la expresión génica relativa de las subunidades formadoras de STOC a nivel pulmonar en ratas expuestas a diferentes periodos de CIH.**

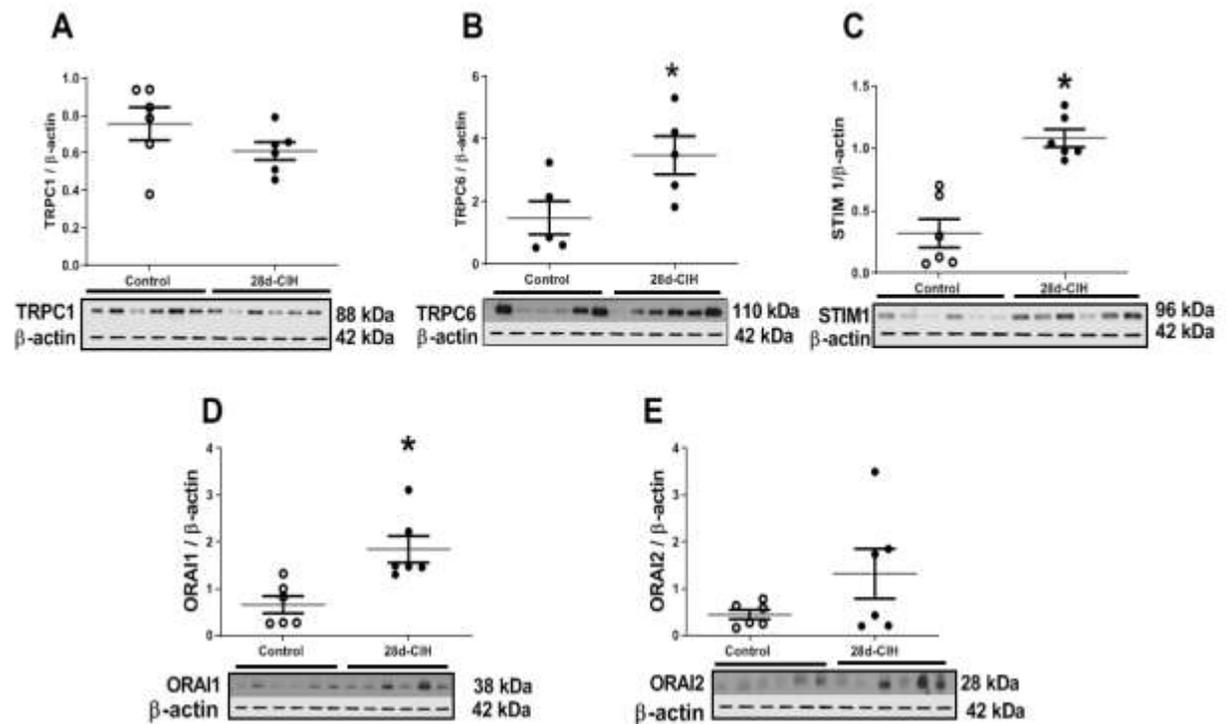
Ratas expuestas a 14, 21 y 28 días de CIH presentaron una mayor expresión génica relativa a nivel pulmonar de TRPC1 y TRPC6 en relación al grupo control (Figura 15A y C). Solamente animales expuestos a 28 días de CIH presentaron una mayor expresión génica relativa de TRPC4 y ORAI1 en relación con los demás grupos experimentales (Figura 15B-D). La expresión génica relativa de ORAI2 no fue afectada por la CIH (Figura 15E).



**Figura 15. Efecto de CIH sobre la expresión pulmonar génica relativa de las subunidades formadoras de STOC en ratas.** Expresión pulmonar génica relativa de (A) TRPC1, (B) TRPC4, (C) TRPC6, (D) ORAI1 y (E) ORAI 2 en ratas controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), 21d-CIH (círculos grises, n=7) y 28d-CIH (círculos negros, n=7). Valores expresados como  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  en relación al control. Valores expresados como promedio  $\pm$  E.S.M. \*  $P < 0,05$  vs. Control, †  $P < 0,05$  vs. Todos los grupos. ANOVA de una vía-seguido por Newman Keuls.

#### **4.1.11. Niveles proteicos de las subunidades formadoras de STOC a nivel pulmonar en animales expuestos a 28 días de CIH.**

Animales expuestos a 28 días de CIH presentaron elevados niveles proteicos de TRPC6, STIM1 y ORAI1 a nivel pulmonar en relación a los controles (Figura 16 B, C y E). Los niveles proteicos de TRPC1 y ORAI2 no presentaron cambios (Figura 16 A y D).

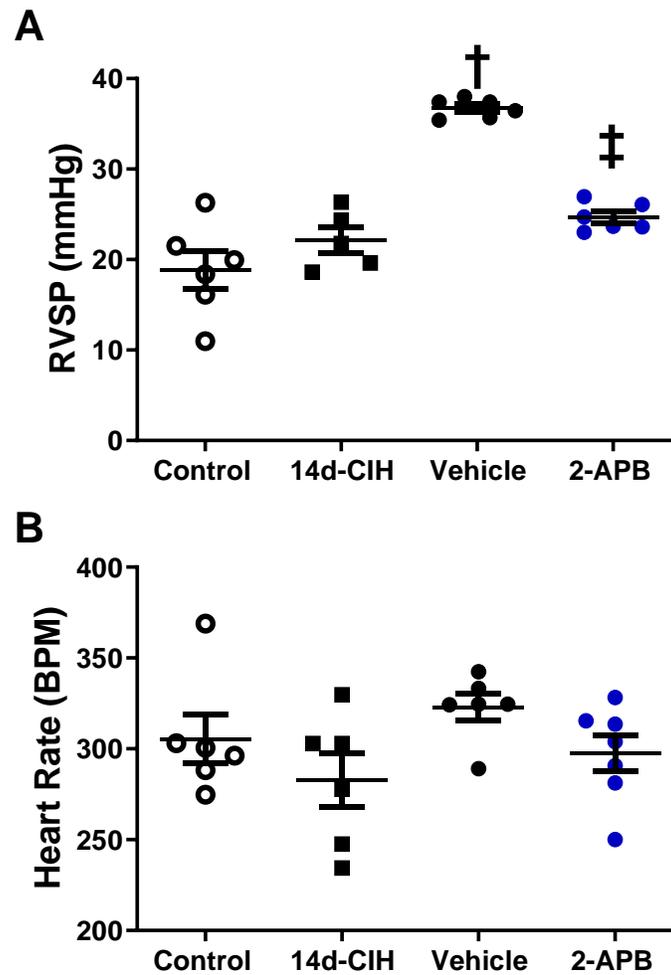


**Figura 16. Efecto de la exposición a 28 días de CIH sobre los niveles pulmonares proteicos de las subunidades formadoras de STOC.** Cuantificación de los niveles proteicos de (A) TRPC1, (B) TRPC6, (C) STIM1, (D) ORAI1 y (E) ORAI2 en macerado de pulmón de animales controles (círculos vacíos, n=6) y 28d-CIH (círculos negros, n=6). Valores expresados como razón de  $\beta$ -actina. Valores promedio  $\pm$  E.S.M. \*  $P < 0,05$  vs. Control, Student t-test Figuras A, B y C, se usó el mismo gel. Figura D y E, mismo gel.

**4.2. Determinar los efectos de la administración in vivo de 2-APB, un inhibidor de la unión STIM-ORAI, sobre la presión pulmonar, contractibilidad vascular y el remodelamiento vascular.**

**4.2.1. El tratamiento con 2-APB previene el aumento de la presión sistólica ventricular derecha en ratas expuestas a hipoxia crónica intermitente.**

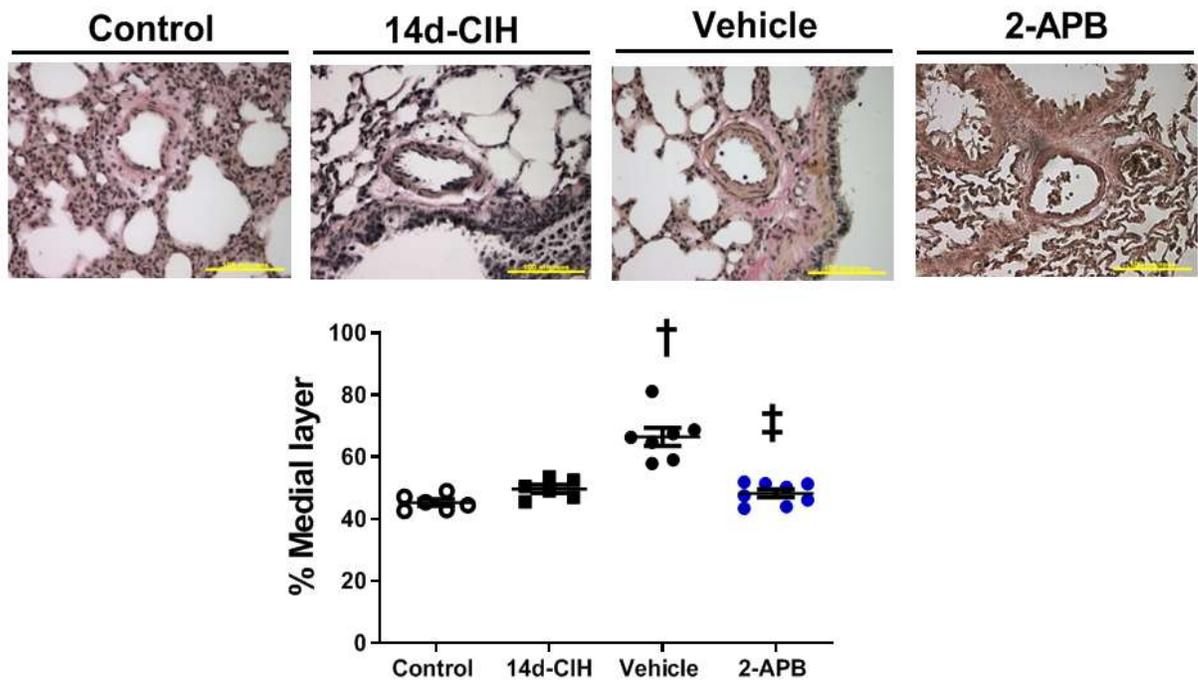
El 2-APB fue administrado mediante bombas osmóticas en ratas expuestas a 28 días de CIH a partir del día 14 de exposición hipóxica. La presión sistólica ventricular derecha (RVSP) y frecuencia cardíaca (HR) fue medida 24h después de la exposición a hipoxia en animales controles y animales expuestos a 14, 28 y tratados con 2-APB. Animales tratados con 2-APB no presentaron un aumento significativo de la RVSP a pesar de estar expuestos a CIH, alcanzando valores similares a los animales de 14d-CIH ( $19,7 \pm 6,4$  mmHg vs.  $22,2 \pm 3,2$  mmHg vs.  $36,5 \pm 1,1$  mmHg vs.  $24,7 \pm 1,6$  mmHg, para controles, 14d-CIH, 28d-CIH y 2-APB, respectivamente) (Figura 17A). La infusión de 2-APB no provocó cambios en la frecuencia cardíaca (Figura 17B).



**Figura 17. Efecto de la administración de 2-APB sobre la presión sistólica ventricular derecha y frecuencia cardíaca en ratas expuestas a CIH.** El 2-APB fue infundido mediante bombas osmóticas en ratas expuestas a 28 días de CIH desde el día 14. (A) Presión sistólica ventricular derecha (RVSP) y (B) frecuencia cardíaca (Heart Rate) en animales Controles (círculos vacíos, n=6) y animales expuestos a 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), Vehículo (círculos negros, n=6) y animales 2-APB (círculos azules, n=7). Valores expresados como promedio  $\pm$  E.S.M. \*  $P < 0,05$  vs. Control, †  $P < 0,05$  vs. Todos los grupos, ‡  $P < 0,05$  vs. 28d-CIH. ANOVA de una vía-seguido Newman Keuls.

#### **4.2.2. El tratamiento con 2-APB impide el desarrollo del remodelamiento vascular pulmonar en ratas expuestas a hipoxia crónica intermitente.**

Animales tratados con 2-APB no presentaron un aumento en el porcentaje de la capa muscular de arterias pulmonares (150-300  $\mu\text{m}$ ) a pesar de estar expuestos a CIH ( $45,40 \pm 3,16$  % vs.  $50,49 \pm 3,06$  % vs.  $66,29 \pm 9,38$  % vs.  $48,21 \pm 3,45$  % para controles, 14d-CIH, 28d-CIH y 2-APB, respectivamente) (Figura 18).

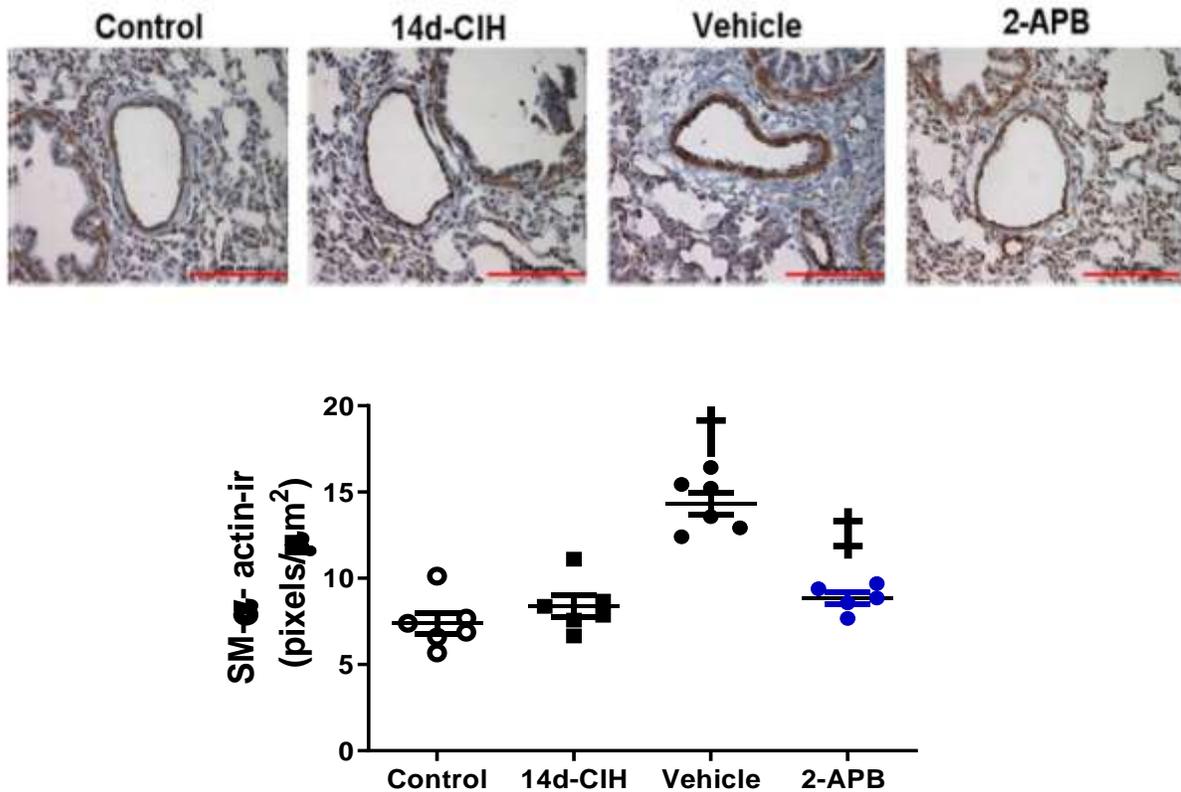


**Figura 18. Efecto de la administración de 2-APB sobre el remodelamiento vascular pulmonar inducido por la exposición a CIH.**

Cuadro superior: Imágenes representativas de arterias pulmonares (150-300  $\mu\text{m}$  de diámetro) teñidas con Van Gieson. Cuantificación del porcentaje de capa media de pequeñas arterias pulmonares de animales controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), Vehículo (círculos negros, n=7) y animales tratados con 2-APB (círculos azules, n=8). La capa media se calculó como  $(\text{área muscular} - \text{área del lumen}) / \text{área muscular} * 100$ . Valores promedio  $\pm$  E.S.M. † P<0,05 vs. Todos los grupos, ‡ P<0,05 vs. 28d-CIH. ANOVA de una vía-Newman Keuls.

#### **4.2.3. El tratamiento con 2-APB previene el aumento de la inmunorreactividad a $\alpha$ -actina inducida por CIH.**

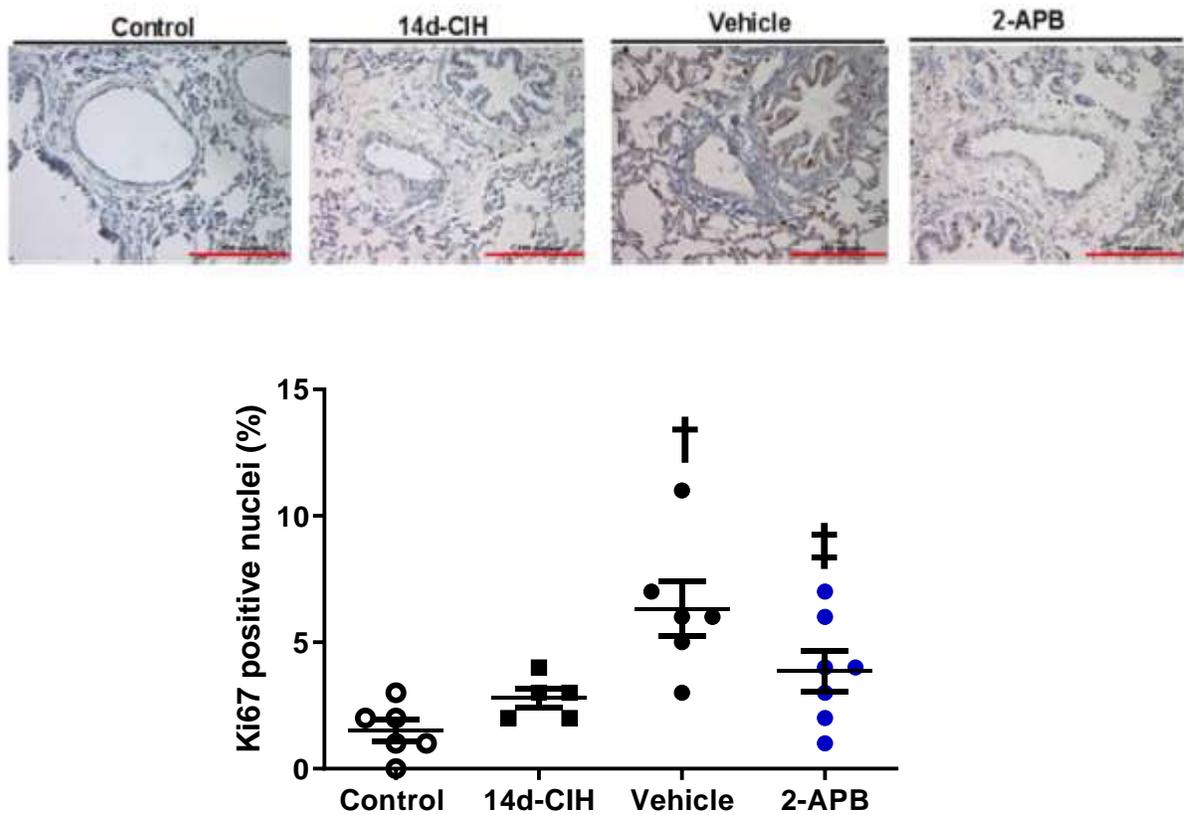
Animales tratados con 2-APB no presentaron aumento de la inmunorreactividad a  $\alpha$ -actina inducida por CIH ( $7,39 \pm 0,62$  vs.  $8,38 \pm 0,65$  vs.  $14,33 \pm 0,65$  vs.  $8,84 \pm 0,35$  pixeles/ $\mu\text{m}^2$ , para controles, 14d-CIH, 28d-CIH y 2-APB, respectivamente) (Figura 19)



**Figura 19. Efecto del 2-APB sobre la inmunorreactividad a  $\alpha$ -actina en arterias pulmonares de ratas.** Cuantificación de la inmunorreactividad a  $\alpha$ -actina en arterias pulmonares de ratas controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), Vehículo (círculos negros, n=7) y animales 2-APB (círculos azules, n=7). Barra =100  $\mu$ m, Aumento= 40X. Valores promedio  $\pm$  E.S.M. † P<0,05 vs. Todos los grupos, ‡ P<0,05 vs. Vehículo. ANOVA de una vía-seguido por Newman Keuls.

#### **4.2.4. El tratamiento con 2-APB previene el aumento de células de PASMC Ki67-positivos inducido por CIH.**

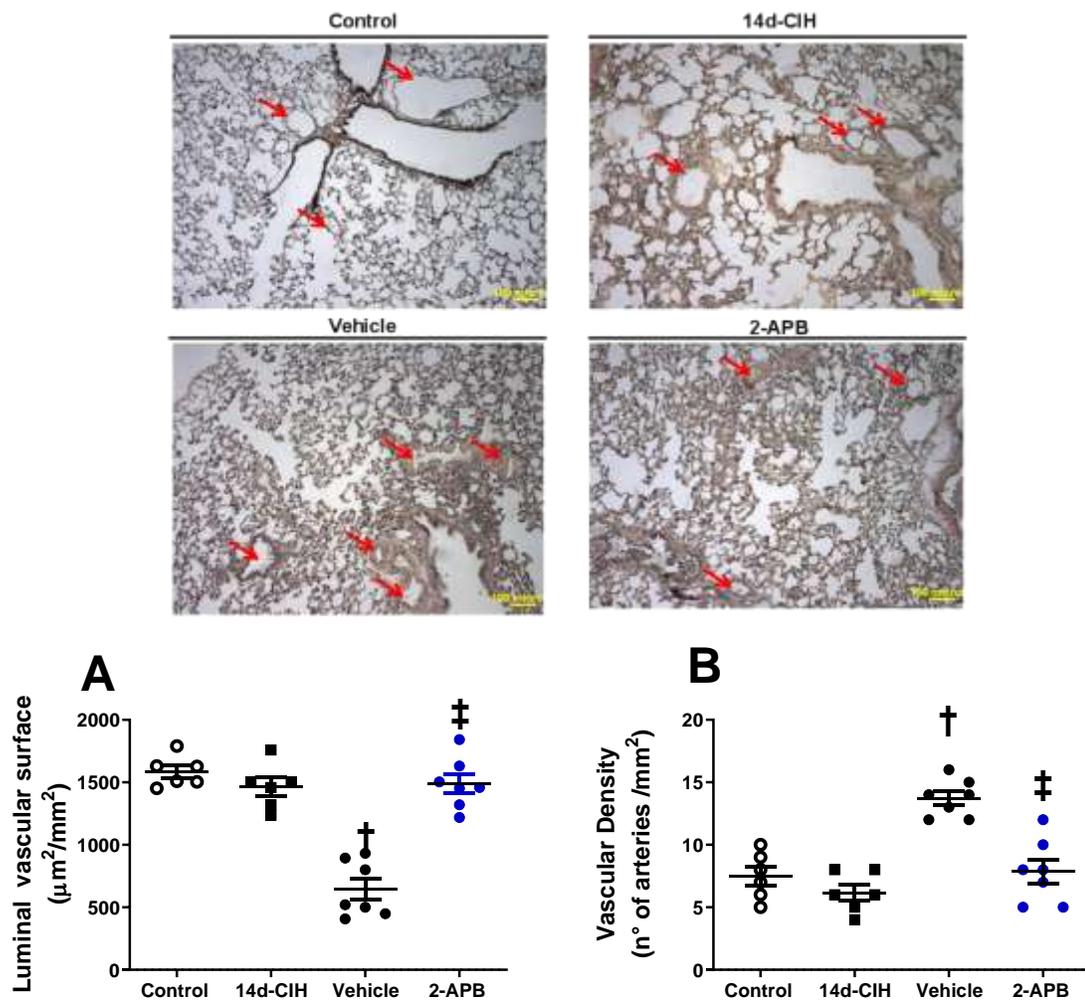
El porcentaje de células positivas para Ki67 en la capa media pulmonar de ratas tratadas con vehículo expuestas a CIH fue mayor que las ratas de control ( $6,3 \pm 1,1\%$  vs. a  $1,5 \pm 0,4\%$ . para Vehículo y grupo Control, respectivamente). El tratamiento con 2-APB previno el aumento de PASMC Ki-67 positivos ( $6,3 \pm 1,1\%$  vs.  $3,9 \pm 0,8\%$  para Vehículo y 2-APB, respectivamente) (Figura 20).



**Figura 20. Efecto del 2-APB sobre la inmunorreactividad a Ki-67 en miocitos vasculares pulmonares de ratas expuestas a CIH.** Conteo de miocitos vasculares pulmonares lisos Ki-67+ en arterias pulmonares de ratas controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=5), Vehículo (círculos negros, n=6) y animales 2-APB (círculos azules, n=8). Barra =100  $\mu$ m, Aumento= 40X. Valores promedio  $\pm$  E.S.M. † P<0,05 vs. Todos los grupos, ‡ P<0,05 vs. Vehículo. ANOVA de una vía-seguido por Newman Keuls.

#### **4.2.5. El tratamiento con 2-APB previene la disminución de la superficie vascular luminal inducida por CIH.**

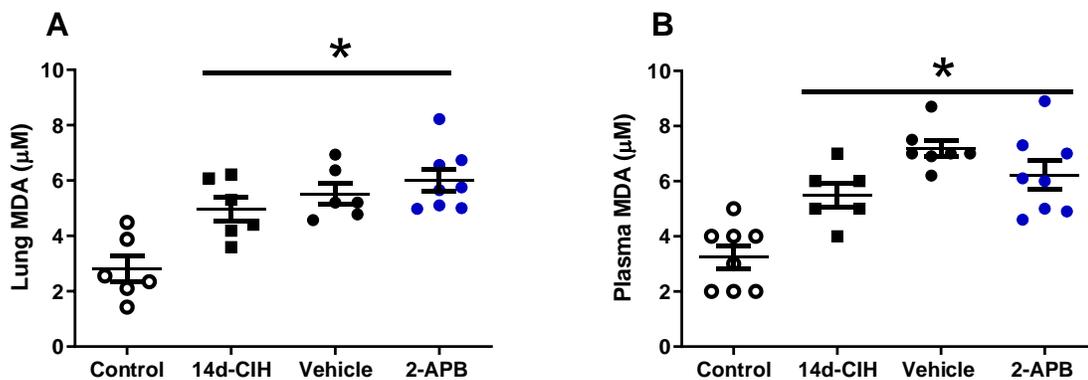
La exposición a CIH durante 28 días aumentó el número de arterias pulmonares pequeñas de 150-300  $\mu\text{m}$  de diámetro interior ( $12,7 \pm 0,7$  vs.  $7,2 \pm 0,6$  arterias/ $\text{mm}^2$ , para vehículo y control, respectivamente). 2-APB normalizó el número de arterias ( $17,9 \pm 0,9$  arterias/ $\text{mm}^2$ , 2APB) (Figura 21A). Además, CIH disminuyó la superficie luminal vascular en los animales tratados con vehículo en comparación con el grupo de control. No obstante, las ratas tratadas con 2-APB evitaron esta disminución a pesar de que las ratas estuvieron expuestas a hipoxia, alcanzando valores similares a los de control ( $1491,0 \pm 72,2$  vs.  $798,8 \pm 71,7$  y  $1633,0 \pm 207,5$   $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ , para control, vehículo y 2-APB, respectivamente) (Figura 21B).



**Figura 21. Efecto del 2-APB sobre la densidad vascular y superficie luminal en pulmones de ratas sometidas a CIH.** Cuadro superior: Reconstrucción de 6 imágenes (10x) pertenecientes al parénquima pulmonar teñidas con Van Gieson. Cuantificación la superficie vascular luminal (A), densidad vascular (B) y relación del volumen luminal en relación a la densidad vascular (C) en animales controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), Vehículo (círculos negros, n=7) y animales 2-APB (círculos azules, n=7). Barra =100  $\mu\text{m}$ , Valores promedio  $\pm$  E.S.M. †  $P < 0,05$  vs. Todos los grupos, ‡  $P < 0,05$  vs. Vehículo. ANOVA de una vía-seguido por Newman Keuls.

#### 4.2.6. El tratamiento con 2-APB no previene el aumento en los marcadores de estrés oxidativo inducidos por CIH.

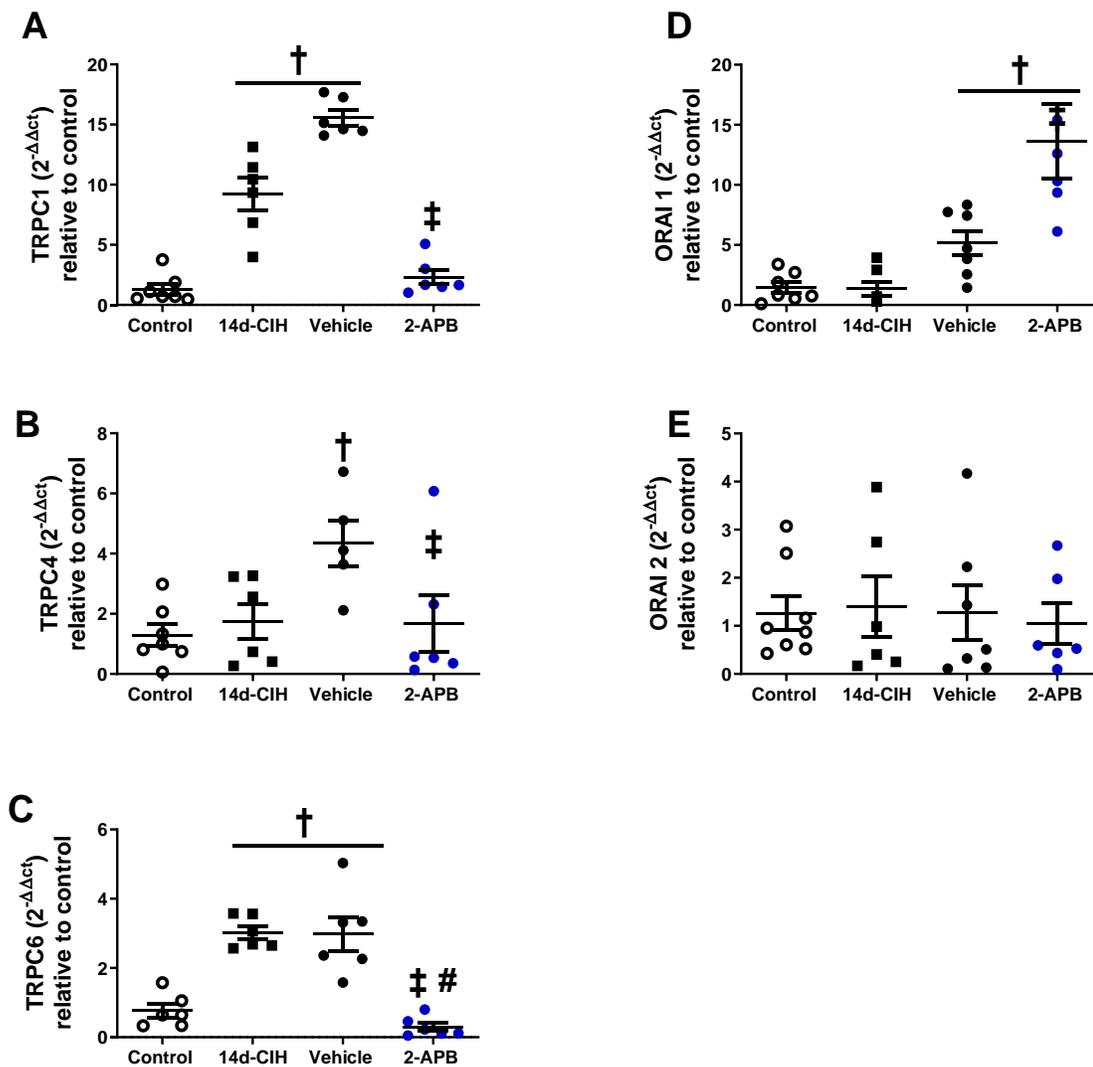
Animales tratados con 2-APB presentaron un aumento en la concentración de MDA tanto circulante como pulmonar en relación a los animales controles. Este aumento fue similar al de los animales expuestos a CIH. (Figura 22 A y B).



**Figura 22. Efecto de la administración de 2-APB sobre la concentración de MDA pulmonar y sistémica.** Se determinó en plasma y en macerado de pulmón la concentración de MDA a nivel sistémico (A) y nivel pulmonar (B) en animales controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), Vehículo (círculos negros, n=7) y 2-APB (círculos azules, n=6). Valores promedio  $\pm$  E.S.M. \*  $P < 0,05$  vs. Control. ANOVA de una vía seguido por-Newman Keuls.

#### **4.2.7. El tratamiento con 2-APB reduce el aumento en la expresión pulmonar génica relativa de TRPC 1,4 y 6 y aumenta ORAI 1.**

Los animales tratados con 2-APB durante 14 días, no presentaron un aumento en la expresión pulmonar génica relativa de TRPC 1, TRPC 4 y TRPC6 inducida por CIH, siendo estos valores similares a los animales control (Figura 23, A-C). Por el contrario, el tratamiento con 2-APB indujo un aumento en la expresión pulmonar génica relativa de ORAI1, la cual fue mayor en comparación a los animales controles y animales expuestos a 28d-CIH (Figura 23D). Con respecto a la expresión de ORAI2, El tratamiento no indujo cambios en su expresión (Figura 23E).

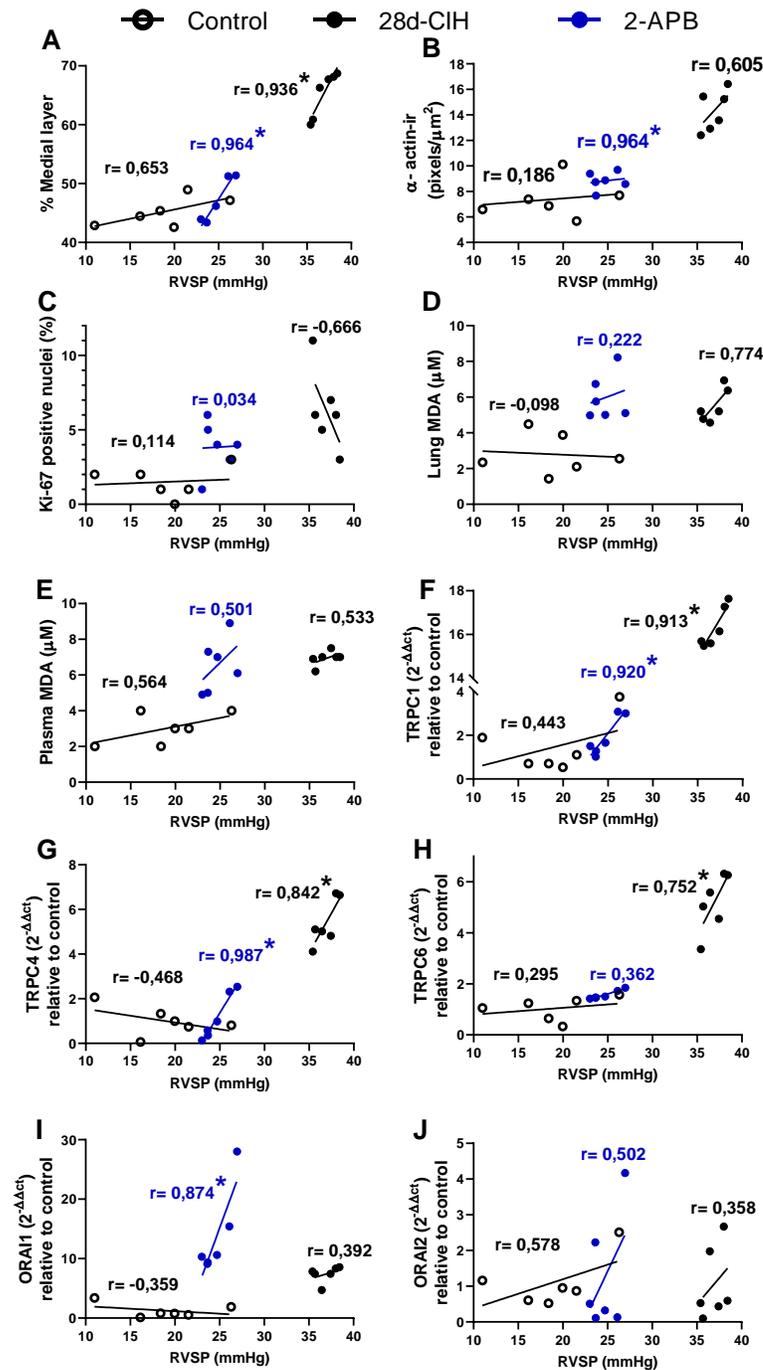


**Figura 23.** Efecto de la administración de 2-APB sobre la expresión génica relativa de STOC en ratas expuestas a CIH. Expresión pulmonar génica relativa de (A) TRPC1, (B) TRPC4, (C) TRPC6, (D) ORAI1 y (E) ORAI 2 en ratas controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), Vehículo (círculos negros, n=7) y animales 2-APB (círculos azules, n=7). Valores expresados como  $2^{-\Delta\Delta CT}$  en relación al control. Valores promedio  $\pm$  E.S.M. \*  $P < 0,05$  vs. Control, #  $P < 0,05$  vs. 14-CIH, †  $P < 0,05$  vs. Todos los grupos, ‡  $P < 0,05$  vs. 28d-CIH. ANOVA de una vía-seguido por Newman Keuls.

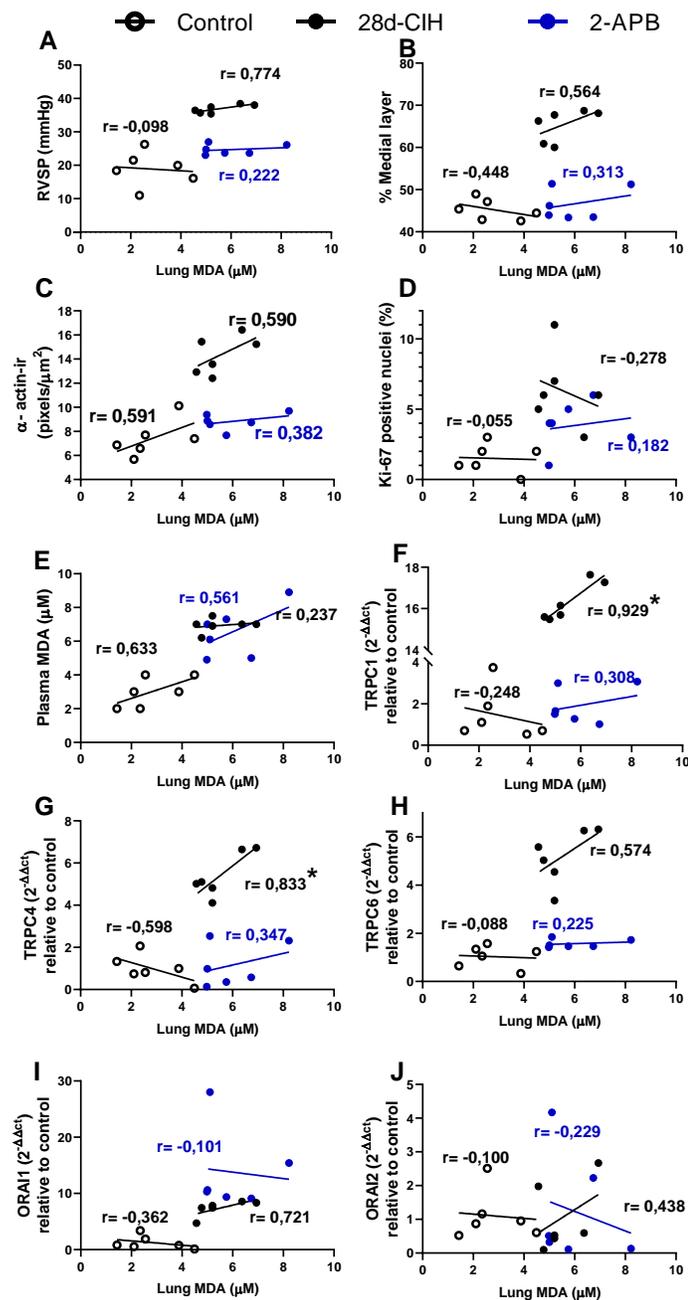
#### 4.2.8. Correlación de Pearson entre variables fisiológicas y expresión de STOC.

Mediante el coeficiente de correlación de Pearson se determinó si la presión ventricular sistólica derecha (RVSP) y los niveles de estrés oxidativos medidos como MDA a nivel pulmonar se correlacionan con las variables medidas en animales Controles, expuestos a 28 días de CIH y animales tratados con 2-APB (Figura 24 y 25). Respecto a las RVSP, los animales Controles no presentaron correlación significativa entre las variables (Figura 24). El grupo expuesto por 28 días a CIH presentó una correlación directamente proporcional al porcentaje capa muscular ( $r= 0.936$ ,  $r^2= 0,878$ ,  $P= 0,006$ ), TRPC1 ( $r=0,913$ ,  $r^2=0,834$ ,  $P= 0,01$ ), TRPC4 ( $r= 0,8418$ ,  $r^2= 0,71$ ,  $P= 0,035$ ) y TRPC6 ( $r=0,894$ ,  $r^2=0,764$ ,  $P=0,049$ ) (Figura 24 A, F, G y H). El grupo tratado con 2-APB, presentó una correlación significativa con el porcentaje capa muscular ( $r= 0.964$ ,  $r^2= 0,930$ ,  $P= 0,001$ ), la inmunorreactividad a  $\alpha$ -ctina ( $r= 0.965$ ,  $r^2= 0,921$ ,  $P= 0,002$ ), TRPC1 ( $r=0,921$ ,  $r^2=0,847$ ,  $P= 0,004$ ), TRPC4 ( $r= 0,987$ ,  $r^2= 0,974$ ,  $P= 0,0001$ ) y ORAI 1 ( $r=0,874$ ,  $r^2=0,763$ ,  $P=0,015$ ) (Figura 24, A, B, F, G y H).

Respecto a las correlaciones en relación al estrés oxidativo medido como MDA a nivel pulmonar, los animales controles no presentaron correlaciones significativas entre las variables. De similar manera, los animales tratados con 2-APB tampoco presentaron correlaciones significativas en relación a las variables. Por otra parte, los animales expuestos por 28 días a CIH presentaron una correlación significativa entre el incremento de MDA a nivel pulmonar y la expresión pulmonar génica de TRPC1 ( $r=0,923$ ,  $r^2=0,862$ ,  $P=0,007$ ) y TRPC4 ( $r=0,833$ ,  $r^2=0,695$ ,  $P=0,039$ ) (Figura 25 F y G).



**Figura 24. Correlación de Pearson de variables fisiológicas en relación a la presión sistólica del ventrículo derecho.** Correlación de Pearson en animales controles (círculos blancos, n=6), expuestos a 28 días de CIH (círculos negros, n=6) y tratados con 2-APB (círculos azules). \*, P < 0,05. En donde  $r = 1$ : correlación perfecta;  $1 > r > 0$ : las variables tienden a incrementar o disminuir juntas;  $r = 0$ : no hay cambio en las variables;  $0 > r$ : una variable aumenta y la otra disminuye.

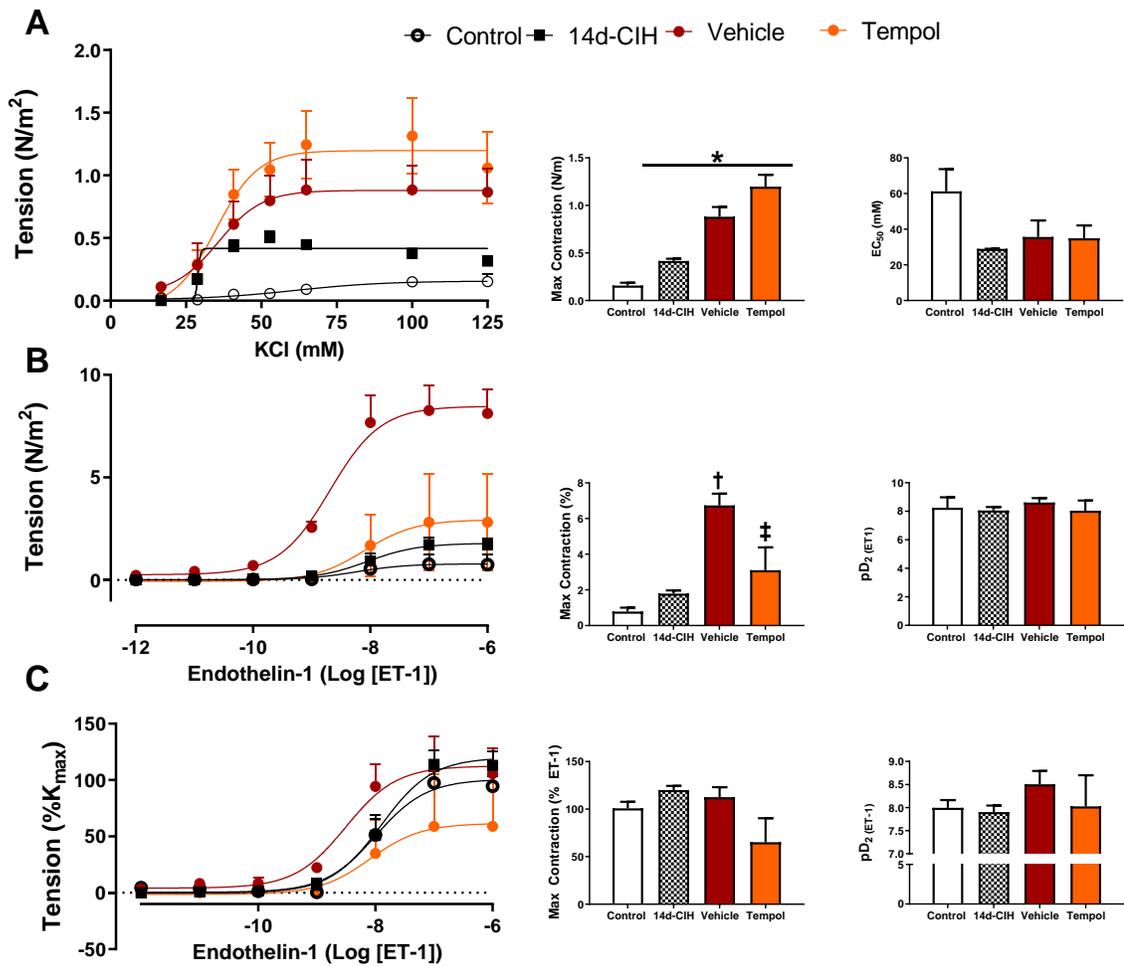


**Figura 25. Correlación de Pearson de variables fisiológicas en relación concentración de MDA a nivel pulmonar.** Correlación de Pearson en animales controles (círculos blancos,  $n=6$ ), expuestos a 28 días de CIH (círculos negros,  $n=6$ ) y tratados con 2-APB (círculos azules). \*,  $P < 0,05$ . En donde  $r = 1$ : correlación perfecta;  $1 > r > 0$ : las variables tienden a incrementar o disminuir juntas;  $r = 0$ : no hay cambio en las variables;  $0 > r$ : una variable aumenta y la otra disminuye.

### **4.3. Determinar los efectos de Tempol sobre la expresión de los STOC, contractibilidad vascular y el remodelamiento vascular en ratas expuestas a CIH.**

#### **4.3.1. Efecto de la infusión de Tempol sobre la función vaso contráctil en arterias pulmonares aisladas de animales expuestos a CIH.**

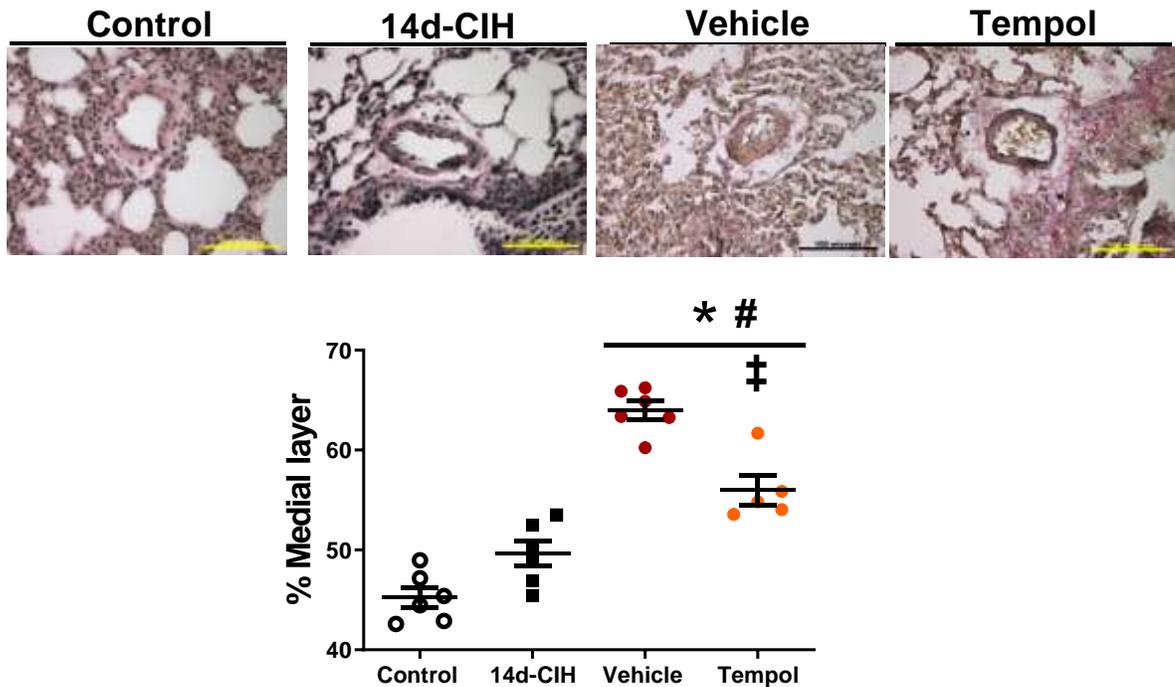
Arterias pulmonares (400-800  $\mu\text{m}$ ) aisladas de ratas tratadas con Tempol presentan una mayor contracción máxima en respuesta a concentraciones crecientes de potasio (KCl) en relación a todos los demás grupos de estudio, junto a un menor EC50 comparado al grupo control (Figura 26A). En relación con valores absolutos, las arterias pulmonares de animales tratados con Tempol presentaron una atenuación de la contracción máxima producida por ET-1, sin cambios en pD2 (Figura 26B). Por el contrario, estas arterias pulmonares no presentaron cambios en respuesta a concentraciones crecientes de ET-1 normalizadas por la respuesta máxima a KCl, presentando similares valores de contracción máxima y pD2 (Figura 26C).



**Figura 26. Efecto del Tempol en la función vasoconstrictora a KCl y ET-1 en arterias pulmonares aisladas.** Pequeñas arterias pulmonares (400-800  $\mu\text{m}$ ) aisladas fueron inducidas a concentraciones crecientes de KCl (A), endotelina-1 (B) y endotelina-1 en relación con la concentración submáxima de KCl (C) en controles (círculos vacíos,  $n=4$ ), 14d-CIH (cuadrados negros,  $n=4$ ), Vehículo (círculos marrones,  $n=5$ ) y animales con Tempol (círculos naranjos,  $n=2$ ). La contracción máxima y potencia ( $pD_2$ ) fueron calculadas para todas las curvas). Valores expresados como promedio  $\pm$  E.S.M. †  $P < 0,05$  vs. todos los grupos, ‡  $P < 0,05$  Vehículo. ANOVA de una vía-Newman Keuls.

#### **4.3.2. El tratamiento con TEMPOL atenúa el efecto de la CIH sobre el remodelamiento vascular pulmonar.**

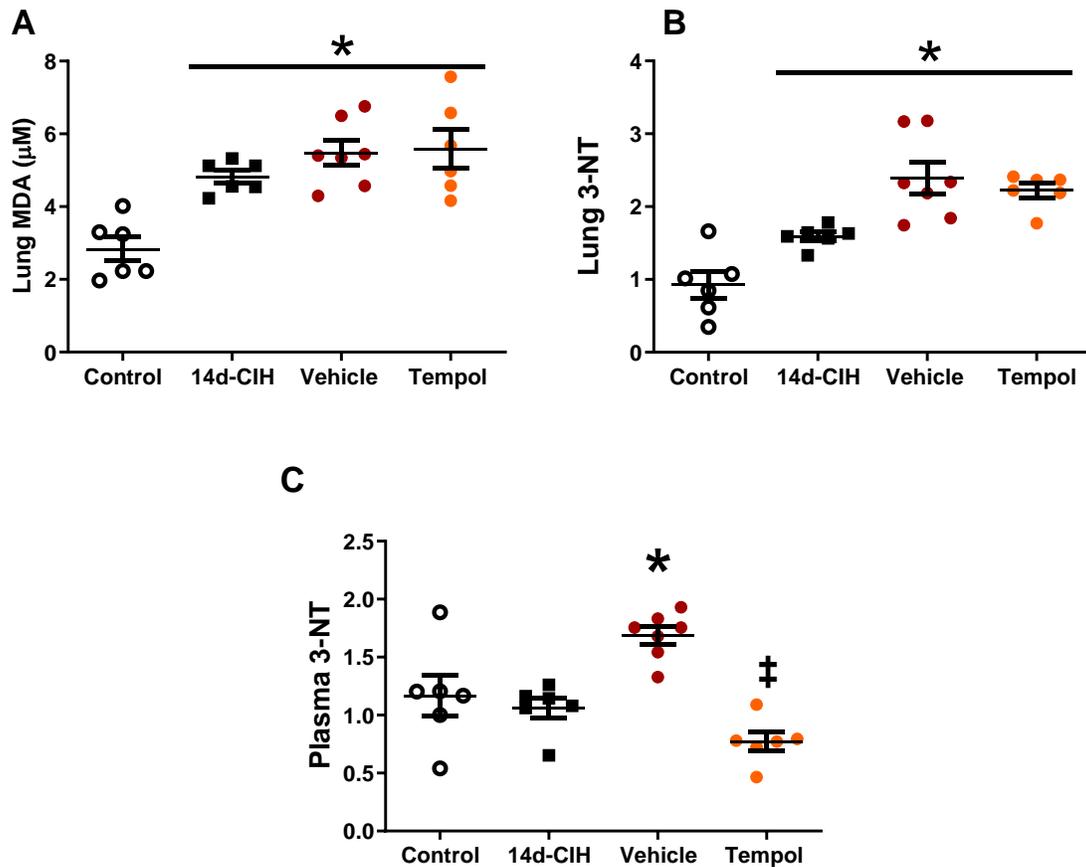
Animales tratados con Tempol presentaron un menor remodelamiento vascular pulmonar en comparación a los animales tratados el vehículo. Sin embargo, estos valores siguen siendo elevados al compararlos con animales controles y animales expuestos a 14d-CIH (Figura 27).



**Figura 27. Efecto de la administración de Tempol sobre el remodelamiento vascular pulmonar inducido por la exposición a CIH.** Cuadro superior: Imágenes representativas de arterias pulmonares (100-300  $\mu\text{m}$  de diámetro) teñidas con Van Gieson. Cuantificación del porcentaje de capa media de pequeñas arterias pulmonares de animales controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), Vehículo (círculos marrones, n=6) y Tempol (círculos naranjos, n=6). La capa media se calculó como:  $(\text{área muscular} - \text{área del lumen}) / \text{área muscular} * 100$ . Barra =100  $\mu\text{m}$ , aumento= 40X. Valores promedio  $\pm$  E.S.M. \* P<0, 05 vs. Control, # P<0, 05 vs. 14d-CIH, ‡ P<0, 05 vs. 28d-CIH. ANOVA de una vía-Newman Keuls.

#### **4.3.4. El tratamiento con Tempol no induce cambios en los marcadores de estrés oxidativo a nivel pulmonar.**

Animales tratados con Tempol no presentaron cambios en la concentración de MDA ni en los niveles de 3-NT a nivel pulmonar (Figura 28 A y B). Por el contrario, en estos mismos animales, este tratamiento previno el aumento en los niveles de 3-NT a nivel sistémico (Figura 28C).

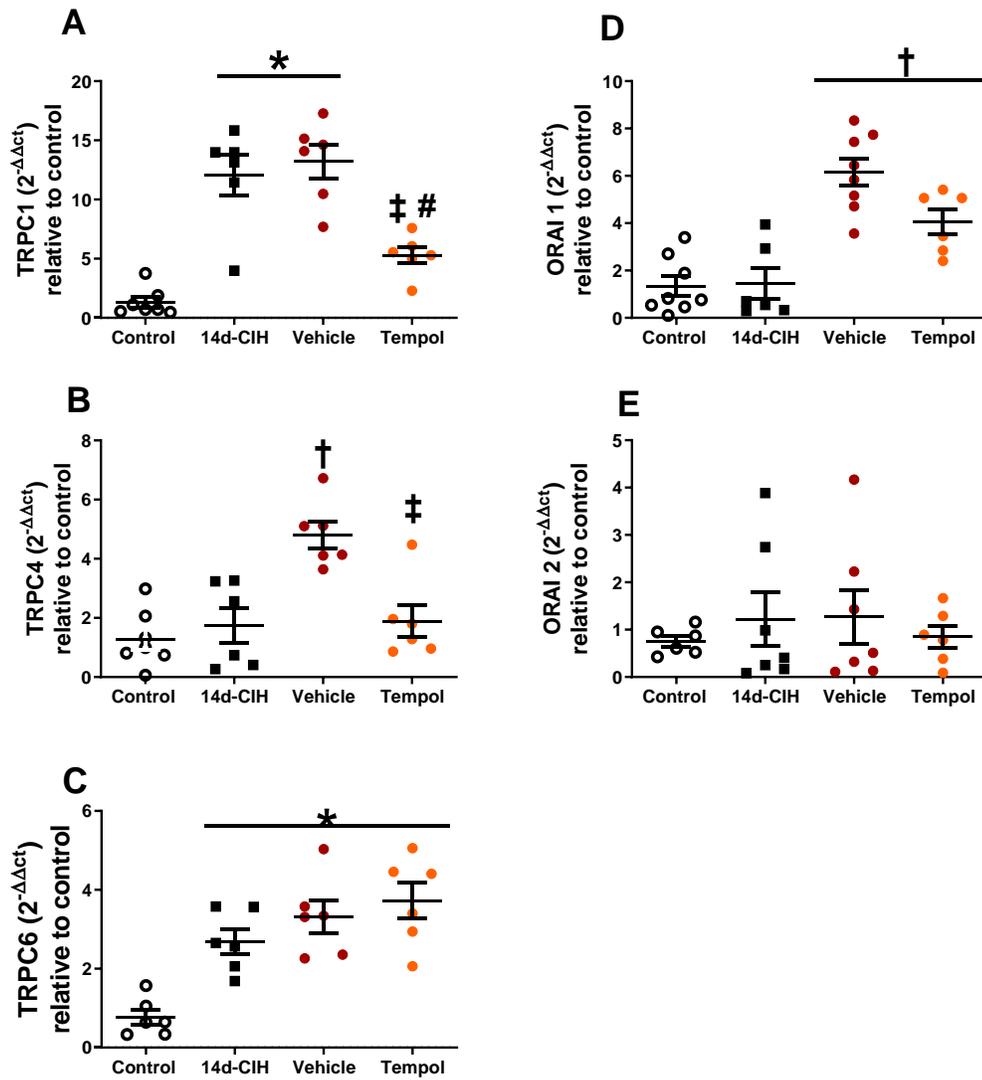


**Figura 28. Efecto de la administración de Tempol sobre los marcadores de estrés oxidativo.**

Se determinó en plasma y en macerado de pulmón la concentración de MDA (A) y los niveles de 3-NT (B y C) en animales controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), Vehículo (círculos marrones, n=7) y Tempol (círculos naranjas, n=6). Valores promedio  $\pm$  E.S.M. \* P<0, 05 vs. Control, ‡ P<0, 05 vs. 28d-CIH. ANOVA de una vía seguido por -Newman Keuls.

#### **4.3.5. El tratamiento con Tempol reduce el aumento en la expresión pulmonar génica relativa de TRPC 1 y TRPC4.**

Los animales tratados con Tempol durante 14 días, no presentaron un aumento en la expresión pulmonar génica relativa de TRPC 1 y TRPC 4 inducida por CIH, siendo estos valores similares a los animales control (Figura 29 A y B). El tratamiento no indujo cambios en la expresión de TRPC6, ORAI 1 y ORAI 2 (Figura 29 C, D y E).



**Figura 29. Efecto de Tempol sobre la expresión pulmonar génica relativa de las subunidades formadoras de STOC.** Expresión pulmonar génica relativa de (A) TRPC1, (B) TRPC4, (C) TRPC6, (D) ORAI1 y (E) ORAI 2 en ratas controles (círculos vacíos, n=6), 14d-CIH (cuadrados negros, n=6), Vehículo (círculos marrones, n=7) Tempol (círculos naranjas, n=6). Valores expresados como  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  en relación al control. Valores expresados como promedio  $\pm$  E.S.M. \*  $P < 0,05$  vs. Control, #  $P < 0,05$  vs. 14d-CIH, †  $P < 0,05$  vs. Todos los grupos, ‡  $P < 0,05$  vs. 28d-CIH. ANOVA de una vía-Newman Keuls.

#### **4.4. Determinar y comparar la expresión diferencial de moduladores conocidos de STOC en el pulmón de animales expuestos a hipoxia sostenida e intermitente, mediante herramientas bioinformáticas.**

##### **4.4.1. Expresión de datos de expresión genética diferencial asociada a modulación de STOC y procesos biológicos inducidos por hipoxia crónica intermitente y sostenida.**

Debido a los limitados datos sobre los efectos de CIH en las vías moleculares subyacentes a la remodelación vascular y la hipertensión pulmonar en el tejido pulmonar, realizamos una colección de datos en la base de datos de Gene Expression Omnibus (GEO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) Entre todos los datos incluidos en esta base de datos GEO, solo hay un conjunto de datos (GSE8705) que contiene tres términos principales de nuestro interés: “hipoxia crónica intermitente”, “hipoxia sostenida” y “pulmón” (Wu *et al.*, 2008). En este estudio, las ratas Sprague-Dawley se expusieron a CIH (ciclos de 90 s de O<sub>2</sub> al 10% seguidos de 90 s de O<sub>2</sub> al 21% durante 12 horas) o hipoxia sostenida (SH) (O<sub>2</sub> al 10%), mientras que las ratas expuestas al aire ambiente fueron utilizadas como controles. Entre otras condiciones en este conjunto de datos, elegimos tres grupos de ratas: 14 días de CIH, 14 días de SH y ratas normóxicas como control. Evaluamos, en este conjunto de datos, los factores involucrados en la expresión de STOC (Tabla 3) y contrastamos la expresión genética diferencial y los procesos biológicos inducido por CIH e hipoxia sostenida (SH). La lista de interés basada en los genes que modulan la expresión del gen STOC y los procesos biológicos (BP) se analizaron en la plataforma DAVID Bioinformatics Resources 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>) (Jiao *et al.*, 2012) (Figura 30). La búsqueda de la expresión génica diferencial (DEG) se realizó con la herramienta GEO2R (Clough y Barrett, 2016). Debido al

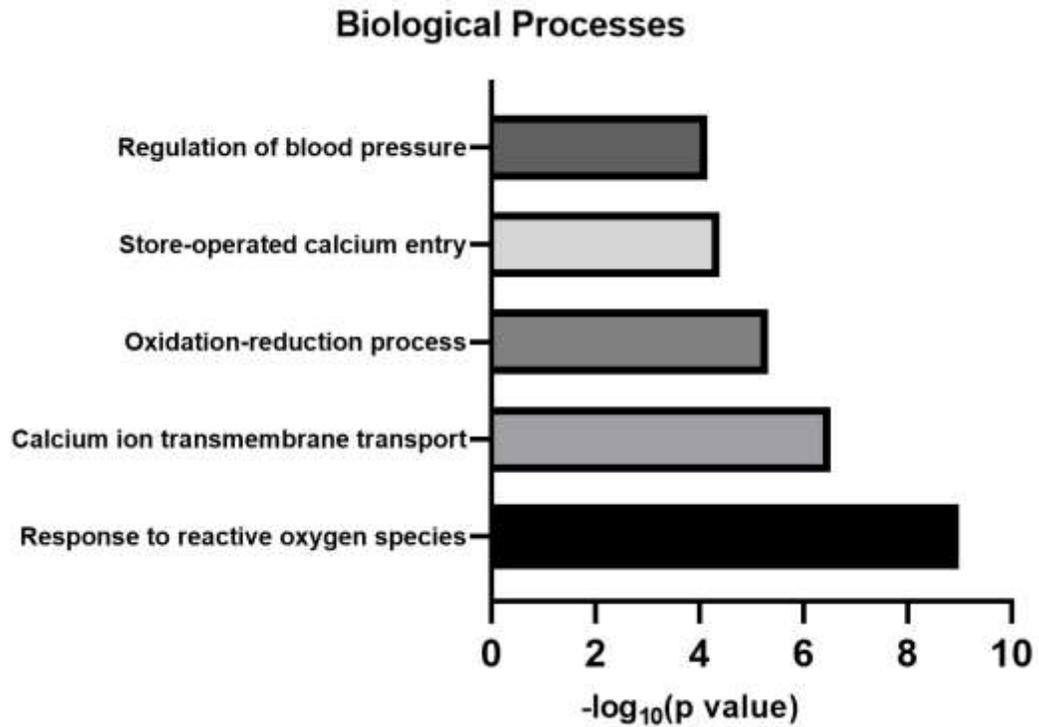
escaso número de muestras disponibles para el análisis, se establecieron como parámetros el valor p-ajustado de la Tasa de Descubrimiento Falso (FDR) de 0,05 y  $|\logFC| > 0,5$  para identificar los genes expresados de forma diferencial con respecto a los controles. Los “heat maps” representativos se muestran en la Figura 31.

**Tabla 3.** Factores involucrados en la modulación génica y protéica de las subunidades formadoras de STOC.

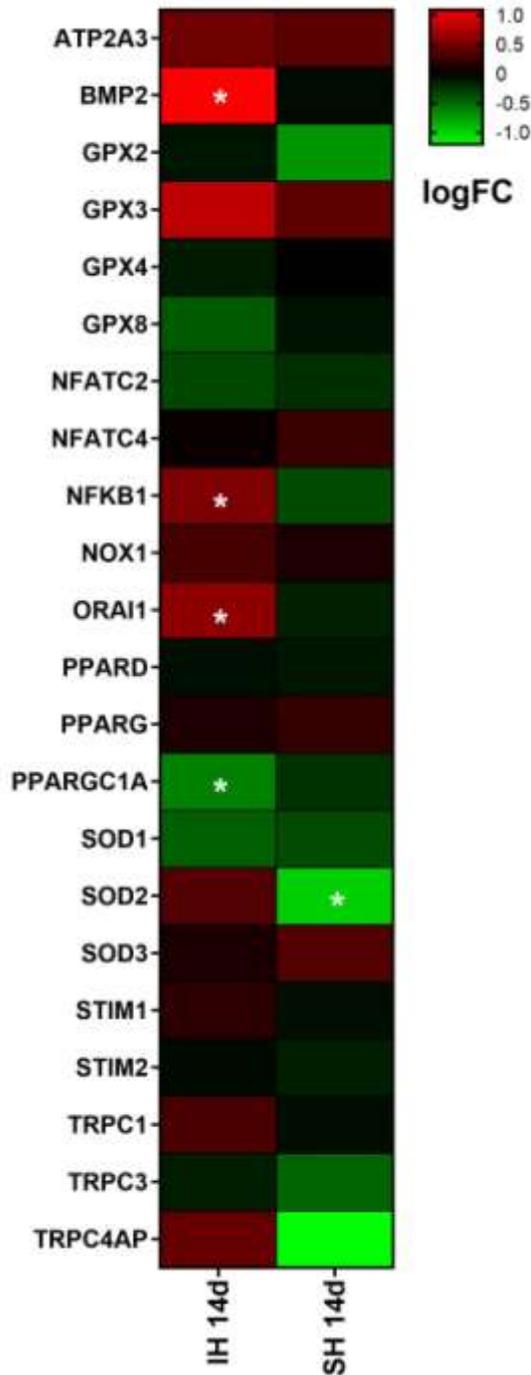
Factores	TRPC1	TRPC3	TRPC4	TRPC6	ORAI1	ORAI2	STIM1
Hipoxia	↑	—	↑	↑	↑	↑	↑
CIH	↑	—	↑	↑	↑		↑
HIF-1 $\alpha$	↑		—	↑	—	↑	
NFAT	↑						
BMP4	↑		↑	↑			
NOX4	↑			↑			
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↑				↑		↑
EPAS		↑	↑				
Ang II	—			↑			
TGF $\beta$ 1	—	—	—	↑			
PDGF	↑		↑	↑	↑		↑
HIF							↑
NF- $\kappa$ $\beta$							↑
AP-1							↑
BMP2	↓		↓	↓			
PPAR $\gamma$	↓			↓			

↑: Upregulated      ↓: Downregulated, —: Unchanged      Empty box: Not Studied.

Modificada de Castillo-Galan *et al.*, 2021.



**Figura 30. Análisis de los procesos biológicos enriquecidos en genes involucrados en la modulación de STOC.** Los valores de p fueron calculados mediante el software DAVID y transformados a  $-\log_{10}$ .



**Figura 31. Heatmap representativo de los genes de interés en ratas expuestas a 14 días de hipoxia sostenida y a 14 días de hipoxia intermitente crónica.** Los genes BMP2, NFKB1 and ORAI1 están sobre-regulados en tejido pulmonar de ratas expuestas a 14 de hipoxia intermitente(IH). El gen SOD2 está diferencialmente expresado en tejido pulmonar de ratas expuestas a 14 días de hipoxia sostenida (SH). Los valores se calcularon mediante la herramienta GEO2R. \*  $p\text{-adj} < 0.05$  ajustado a FDR.

## 5. DISCUSIÓN

### **5.1. La exposición a CIH induce hipertensión pulmonar y aumenta la expresión pulmonar de los STOC.**

Los resultados mostraron que la exposición de ratas durante 14-28 días a CIH aumentó progresivamente la respuesta vasoconstrictora al KCl y a ET-1 en arterias pulmonares de resistencia, produciendo remodelado vascular pulmonar, y aumento de la RVWT y de RVESV medidos por resonancia magnética. CIH produjo además un aumento progresivo de RVSP sobre 30 mmHg a los 28 días de exposición. La expresión de genes y proteínas de los canales TRPC 6, ORAI 1, ORAI 2 y STIM 1 en el tejido pulmonar aumentó a los 21-28 días de CIH, en paralelo con los cambios morfológicos y funcionales. La administración de 2-aminoetildifenilborinato (2-APB), un bloqueador de los STOC, previno el aumento de RVSP, la remodelación vascular y el aumento de los niveles de  $\alpha$ -actina en arterias pulmonares pequeñas inducidos por CIH. Además, 2-APB impidió el aumento de la expresión génica pulmonar de las subunidades STOC. Sin embargo, 2-APB no redujo el estrés oxidativo a nivel sistémico y pulmonar. Los resultados sugieren que los STOC juegan un papel clave en el desarrollo de la remodelación vascular y la hipertensión pulmonar inducida por CIH, por un mecanismo independiente de estrés oxidativo.

En consecuencia, los resultados confirman y amplían observaciones previas que la exposición de ratas a CIH (O<sub>2</sub> 4-8%, 8 h/día) durante 28 días aumenta la RVSP (35,0-37,5 mmHg),

aumenta el índice de Fulton e induce remodelación arterial pulmonar (Jin *et al.*, 2014; Nara *et al.*, 2015). Una contribución importante de nuestros resultados es la observación que tiempos de exposición a CIH más cortos producen alteraciones cardiopulmonares patológicas. La RVSP y el área de la capa medial aumentaron al día 21 de CIH, mientras que la actividad contráctil a KCl y a ET-1 aumentó a los 14 días de CIH. El aumento de la contracción en respuesta al KCl se ha relacionado con la cantidad de capa muscular de los vasos o con la eficiencia de los mecanismos de contracción dependientes de canales de calcio voltaje dependientes de tipo L o T (Reyes *et al.*, 2018; Wan *et al.*, 2010). Por otro lado, la contracción en respuesta a ET-1 se relaciona principalmente con la movilización de las reservas de calcio desde el retículo sarcoplásmico, que están asociadas a la activación de STOC resultante de la depleción de las reservas de calcio reticular (Reyes *et al.*, 2018; Parrau *et al.*, 2013). La hiperreactividad a ET-1 coincide con la aparición de engrosamiento de la pared arterial pulmonar y aumento de RVSP en el día 21, lo que sugiere que la señalización de ET-1 y probablemente la entrada de calcio asociada a STOC es necesaria para producir la hipertensión arterial pulmonar y remodelación patológica en respuesta a CIH. Estudios en arterias sistémicas de ratas CIH han mostrado que el deterioro de la función vascular se produce por una disminución de la relajación dependiente del endotelio y un aumento de la respuesta constrictora al KCl, que se correlaciona con el grosor aumentado de la pared arterial (Krause *et al.*, 2015; Krause *et al.*, 2018). En esta tesis no se abordó la contribución de los agentes relajantes derivados del endotelio, y no se puede descartar su contribución a la disfunción vascular pulmonar.

Encontramos que CIH aumentó la expresión génica pulmonar de los canales TRPC1 y TRPC6 a los 14 días de CIH, mientras que la expresión de las subunidades TRPC4 y ORAI1 aumentó

en ratas expuestas a 28 días de CIH durante. De manera similar, en el tejido pulmonar de ratas aumentaron los niveles de proteína de TRPC6, STIM1 y ORAI1, mientras que los niveles de TRPC1 y ORAI2 permanecieron sin cambios durante la exposición CIH. Por lo tanto, los cambios en la expresión de las subunidades STOC aumentaron en paralelo a los cambios pulmonares vasculares morfológicos y funcionales inducidos por CIH. La expresión génica y proteica de las subunidades STOC inducidas por hipoxia depende de la modalidad sostenida o intermitente, del tiempo de exposición, y la duración del estímulo hipóxico. Se ha reportado una sobreexpresión de Orai1 y Orai2 en arterias pulmonares sin endotelio de ratas sometidas a 21 días de hipoxia sostenida (Wang *et al.*, 2017); sobreexpresión de Stim1, TRPC1 y Orai1 en PASMC cultivadas sometidas a 12-48 h de hipoxia (Chen *et al.*, 2017). La inducción de Stim1, Stim2, Orai1, Orai2 y TRPC6 se produce en PASMC sometidas a 72 h de hipoxia sostenida, (He *et al.*, 2018) mientras que el aumento de TRPC4 y Stim1 se encontró en pulmones de ovejas recién nacidas sometidas a hipoxia hipobárica durante la gestación (Parrau *et al.*, 2013). Se sabe que la hipoxia sostenida produce remodelado vascular pulmonar caracterizado por hipertrofia y /o hiperplasia de PASMC, lo que lleva a vasoconstricción e hipertensión pulmonar (Sylvester *et al.*, 2012). De manera similar, la CIH produjo remodelado vascular pulmonar e hipertensión.

Se ha propuesto que el estrés oxidativo y la activación de vías inflamatorias están implicados en las alteraciones vasculares pulmonares inducidas por la CIH (Jin *et al.*, 2014; Nara *et al.*, 2015; Nisbet *et al.*, 2009). Se sabe que el patrón de CIH utilizado en este estudio produce estrés oxidativo sistémico (Del Rio *et al.*, 2010) y disfunción endotelial (Krause *et al.*, 2015; Krause *et al.*, 2018), lo que se condice con los resultados observados en el pulmón, en el cual el estrés oxidativo se establece desde el día 14 y se mantiene hasta el día 28 de exposición a

CIH tanto a nivel pulmonar como a nivel sistémico. Los niveles altos de ROS elevan los niveles de calcio en PASMC, que es el factor clave en la diferenciación y proliferación del músculo liso vascular (Shao *et al.*, 2016; Waypa *et al.*, 2002). En las PASMC, el calcio puede aumentar mediante la activación de dos mecanismos: (1) liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, mediada por canales intracelulares sensibles al inositol trifosfato (IP3R) o por receptores de rianodina (RyR), o (2) por la entrada de calcio desde el espacio extracelular espacio mediado por el intercambiador de  $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ , los canales de calcio tipo L y los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  activados por estiramiento. Además, los canales TRPC-ORAI activados por STIM juegan un papel clave en la homeostasis del calcio intracelular, que es crucial para la contracción y remodelación arterial pulmonar patológica, incluida la migración, diferenciación y proliferación de miocitos y fibroblastos arteriales pulmonares en respuesta a la hipoxia aguda y sostenida. (Reyes *et al.*, 2018; Weigand *et al.*, 2005; Castillo-Galán *et al.*, 2016; Parrau *et al.*, 2013; Golovina *et al.*, 2001; Lu *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2017; Guibert *et al.*, 2011). La evidencia disponible sugiere que el aumento de calcio y la vasoconstricción en respuesta a la hipoxia aguda y a ET-1 dependen de STOC (Weigand *et al.*, 2005; Castillo-Galán *et al.*, 2016, Parrau *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2008).

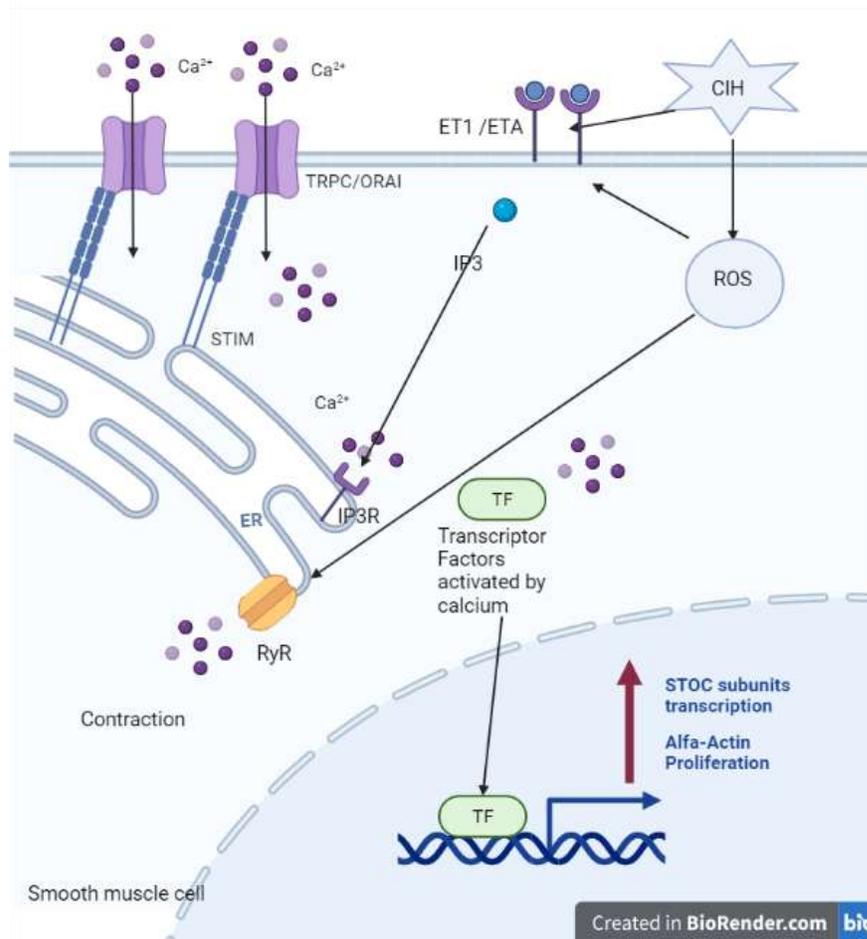
Por otra parte, se ha demostrado que la exposición a CIH induce una disminución en la ganancia de peso (Martins *et al.*, 2021). Esto se condice con nuestros resultados, en los animales animales expuestos a 14 días de CIH, presentan una menor ganancia de peso en relación a animales controles de la misma edad. Esta diferencia de peso se mantiene hasta el día 21 de exposición a CIH, sin embargo, a los 28 días de CIH, estos animales presentan una ganancia de peso similar que animales controles de la misma edad. Por ende, no existiría una

variable extra (efecto en la ganancia de peso) al momento de comparar otras variables como las analizadas en este estudio.

En conclusión, los resultados de la primera parte de este trabajo muestran que la disfunción vascular pulmonar resultante de la CIH se produce a través de un aumento progresivo de la reactividad contráctil y remodelación de las arterias pulmonares, afectando a un plazo mayor la función del ventrículo derecho. Además, estos cambios van acompañados de una mayor expresión de canales TRPC y ORAI1, lo que sugiere un papel crucial para STOC en el desarrollo de remodelación vascular pulmonar e hipertensión pulmonar inducida por CIH. (Tabla 4).

**Tabla 4.** Resumen de los efectos de CIH sobre parámetros cardiovasculares y subunidades STOC.

Días CIH	RVSP	Contractibilidad		Remodelamiento		Estrés oxidativo		Subunidades STOC						
		KCl	ET-1	Capa media	$\alpha$ -actina	MDA	3-NT	TRPC			STIM	ORAI		
								1	4	6	1	1	2	
14d-CIH	-	+	-	-	-	+	+			+				-
21d-CIH	+	+	+	+	+	+	+	+		+				-
28d-CIH	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	-



**Figura 32. Modelo propuesto de inducción de STOC a partir de los 21 días de CIH.**

CIH aumenta la contracción máxima inducida por concentraciones crecientes de ET-1, lo que sugiere un aumento en los niveles de los receptores ETA. La interacción entre ET-1 y el receptor ETA produce IP3 que interactúa con su receptor IP3R en el retículo sarcoplasmático (RS), liberando Ca<sup>2+</sup>. A su vez, 21 días de CIH, se establece estrés oxidativo a nivel pulmonar, el cual puede aumentar ET-1 y a su vez la liberación de calcio mediante RyR. El vaciamiento de calcio desde el RS, activará STIM con la subsecuente activación de STOC, permitiendo la entrada de calcio desde el extra al intracelular. Esto a su vez, permitiría la activación y estabilización de factores de transcripción sensibles a calcio, los cuales están involucrados en la modulación positiva de genes asociados a las subunidades de STOC, proliferación celular y remodelado vascular pulmonar. A su vez, el incremento de calcio intracelular favorecerá un estado vasoconstrictor de la celular muscular lisa. Esto se traduce en un aumento de la RVSP y del remodelado vascular pulmonar, induciendo hipertensión pulmonar.

## **5.2 El tratamiento con 2-APB previene la hipertensión pulmonar inducida por CIH.**

Estudiamos los efectos de 2-APB, una droga con acción inhibitoria inespecifica de STOC (Bootman *et al.*, 2002), sobre el remodelamiento vascular y la hipertensión pulmonar inducida por CIH. De acuerdo con estudios previos, las ratas expuestas a CIH durante 28 días, mostraron remodelamiento de la capa media de arterias pulmonares y una presión sistólica ventricular derecha elevada (Jin *et al.*, 2016). Los principales hallazgos de esta parte de esta tesis mostraron que el tratamiento con 2-APB previene el aumento de RVSP, el remodelamiento vascular pulmonar caracterizada por un aumento de  $\alpha$ -actina-ir en la capa medial y la proliferación de PASMC, y una reducción de la superficie vascular luminal. Por lo tanto, los resultados sugieren fuertemente que los STOC están involucradas en la hipertensión pulmonar y en el remodelamiento vascular en este modelo preclínico de AOS. Nuestros resultados muestran que la infusión de 2-APB previene el aumento de RVSP inducida por CIH, los que coinciden y con estudios que muestran que 2-APB atenúa la remodelación pulmonar, el aumento de RVSP y el índice de fulton en ratones expuestos durante 4 semanas a hipoxia sostenida, en comparación con los animales hipóxicos tratados con vehículo (Smith *et al.*, 2015). Además, la infusión diaria de 2-APB redujo la remodelación vascular y la hipertensión pulmonar inducida por la hipoxia pregestacional en corderos recién nacidos a gran altura (Castillo-Galán *et al.*, 2016).

Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con 2-APB previene la sobreexpresión de subunidades STOC inducida por CIH en tejido pulmonar. Se sabe que la vía del receptor inositol trifosfato-endotelina-1 (ET-1-IP3R) está sobrerregulada en condiciones de CIH, e induce la activación de STOC (Castillo-Galán *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2012), aumentando la

concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Reyes *et al.*, 2018). Además, los factores de transcripción inducidos por hipoxia tales como HIF, NFAT, AP-1, NF-KB y factor de crecimiento derivado de plaquetas, que regulan la expresión génica de las subunidades STOC (Wang *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2014; Salnikow *et al.*, 2002; Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2015; Ogawa *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 1998; Mottet *et al.*, Shibasaki *et al.*, 1996; Timmerman *et al.*, 1996; Dolmetsch *et al.*, 1997) son activados / estabilizados por  $\text{Ca}^{2+}$ . En conjunto, esta evidencia sugiere que el bloqueo de STOC con 2-APB induciría una disminución del calcio intracelular (Parrau *et al.*, 2013) evitando la regulación positiva de TRPC1, TRPC4 y TRPC6. Respecto a la sobre-expresión de ORAI1, podría deberse a un efecto compensatorio, ya que el 2-APB inhibe la interacción STIM/ORAI. Sin embargo, se requieren más estudios para determinar si estos factores que regulan los STOC presentan algún cambio después de la exposición a CIH.

Se ha estimado la dosis de (10 mg/kg/día), que previno la hipertensión pulmonar en este modelo, debería alcanzar una concentración del orden de 10-100  $\mu\text{M}$  en el espacio extracelular (Parrau *et al.*, 2013), una concentración en la cual el 2-APB que inhibe STOC en células HEK293 transfectadas con subunidades Orai/Stim o TRPC (Lievremont *et al.*, 2005). En arterias pulmonares aisladas de corderos recién nacidos hipóxico-hipertensos, SKF-96365, un bloqueador de STOC sin acción sobre IP3R, induce una relajación similar a 2-APB (Parrau *et al.*, 2013). Ya sea que 2-APB esté actuando sobre IP3R, STOC o en ambos, la entrada de calcio vía STOC es la que mantiene las concentraciones de calcio elevadas en respuesta a hipoxia en PASM (Sylvester *et al.*, 2012). Estas evidencias sugieren que en nuestro modelo, 2-APB actuaría preferentemente sobre el STOC, pero no podemos descartar el efecto del

fármaco sobre los otros objetivos mencionados anteriormente, y se necesitan más experimentos para abordar esta importante pregunta.

La CIH induce estrés oxidativo a nivel pulmonar y sistémico, que puede alterar la homeostasis del calcio y contribuir a la remodelación vascular pulmonar (Del Rio *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2016). Estudios previos, en modelos de hipertensión pulmonar inducida por exposición a CIH, han demostrado que el tratamiento con antioxidantes como la procianidina y la melatonina reducen la RVSP y el remodelamiento vascular pulmonar (Jin *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2016). Aunque, se ha sugerido una acción antioxidante de 2-APB en un modelo de daño por isquemia/reperfusión en cardiomiocitos de ratones (Moriyama *et al.*, 2005), nuestros resultados muestran que 2-APB no previene el estrés oxidativo, lo que sugiere que los efectos de 2-APB observados en la vasculatura pulmonar no estarían directamente relacionadas con una reducción del estrés oxidativo, sino con una acción inhibitoria de STOC (Bootman *et al.*, 2002). Así, el tratamiento de ratas hipertensas pulmonares hipóxicas con 2-APB, tiene un fuerte efecto previniendo el aumento de la RVSP y el remodelado vascular pulmonar, sin ninguna acción significativa sobre los marcadores de estrés oxidativo. Teniendo en cuenta que el 2-APB no es un bloqueador específico de STOC, se necesitan nuevos más estudios con fármacos que bloqueen específicamente los STOC como el CM-4620, el cual presenta bloquea específicamente la interacción ORAI1/STIM1, para evaluar el papel del STOC en pacientes con AOS con hipertensión pulmonar (Waldron *et al.*, 2019).

Sumado a lo mencionado anteriormente, se encontró que, animales expuestos a 28 días de CIH, el aumento de RVSP, remodelamiento vascular pulmonar y el aumento en la expresión pulmonar génica de TRPC1, TRPC4 y TRPC6 están correlacionadas entre sí. Poniendo estos

resultados en contexto, la RVSP aumenta en conjunto con el remodelamiento y la expresión de los STOC. Los animales tratados con 2-APB, presentaron una correlación significativa entre la RVSP, el remodelamiento vascular pulmonar y la expresión pulmonar génica de TRPC1, TRPC4. Esto sugiere que la disminución de la RVSP va en paralelo a un efecto antiremodelante del 2-APB, lo que también va en directa correlación a la disminución de los canales STOC. Sugiriendo un rol de los canales STOC, específicamente de las sub-unidades TRPC1, TRPC4 y TRPC6 en el desarrollo de la hipertensión pulmonar inducida por CIH.

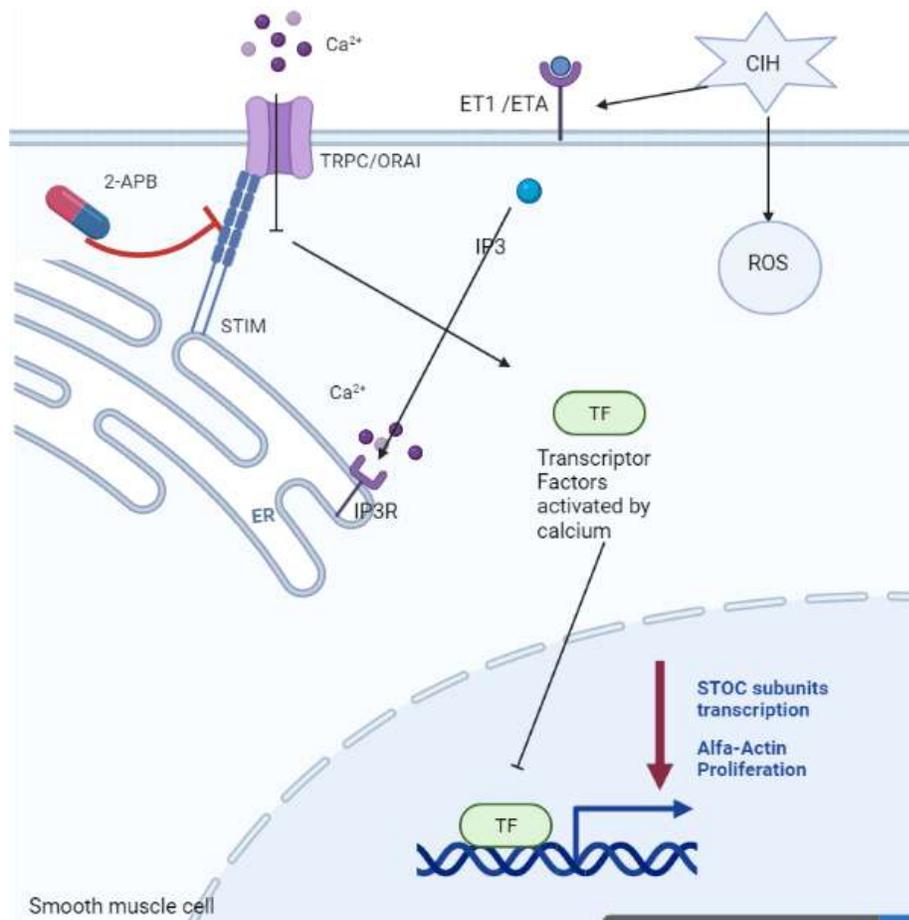
Al momento de analizar las correlaciones en relación al estrés oxidativo a nivel pulmonar determinado como MDA, los animales expuestos a 28 días de CIH, presentaron una correlación con la expresión de TRPC1 y TRPC4, en donde estas variables aumentan en paralelo. Por el contrario, los animales tratados con 2-APB no presentaron correlaciones significativas entre las variables analizadas. Esto sugiere un rol de los STOC como agentes claves en el desarrollo de la HP inducida por exposición a CIH y que el efecto anti-hipertensivo no se correlaciona con el estrés oxidativo a nivel pulmonar medido como MDA.

Actualmente, no existe un tratamiento eficaz para la hipertensión pulmonar. El tratamiento con 2-APB evitó el aumento de la presión sistólica del ventrículo derecho y el remodelado vascular pulmonar, sin efectos sobre los marcadores de estrés oxidativo tanto sistémico como pulmonar. Estos resultados sugieren que el bloqueo STOC podría ser una estrategia atractiva para prevenir la hipertensión pulmonar en episodios hipóxicos intermitentes crónicos como la patología de la AOS. En resumen, los resultados actuales sugieren que 2-APB previno las alteraciones cardiopulmonares inducidas por la CIH, sugiriendo que el bloqueo de STOC puede potencialmente usarse para tratar la hipertensión pulmonar inducida por AOS.

**Limitaciones del objetivo y proyecciones.**

Debido al estallido social ocurrido el 18 de octubre del 2019 y la crisis sanitaria por la pandemia mundial de SARS-COV2, fue imposible completar a cabalidad este objetivo. Por lo tanto, sería muy interesante poder realizar experimentos para:

- 1) Determinar el efecto de 2-APB sobre el efecto de CIH (14 y 28 días) en la morfología y función cardíaca mediante MRI.**
- 2) Determinar el efecto del 2-APB en la contracción dependiente de KCl y endotelina en pequeñas arterias pulmonares de animales sometidos a CIH.**
- 3) Estudiar la contracción dependiente de STOC en pequeñas arterias pulmonares de animales sometidos a CIH.**
- 4) Determinar la localización de las subunidades de STOC en cortes de tejido pulmonar de animales sometidos a CIH.**



**Figura 33. Modelo especulativo de la acción de 2-APB.** A los 14 días de exposición a CIH existe un aumento en la expresión de los STOC, del estrés oxidativo y de la contracción máxima a ET-1. La interacción entre ET-1 y el receptor ETA libera IP3, el cual al interactuar con su receptor IPR3 ubicado en el retículo sarcoplasmático, provocará la salida de calcio. STIM, proteína que se encuentra en el retículo, al detectar esta salida de calcio, translocará a la region punctae del retículo, intractuando con TRPC u ORAI ubicados en la membrana plasmática, permitiendo la entrada de calcio desde el espacio extracelular. En este modelo, al inhibir la interacción de STIM-ORAI con 2-APB a los 14 días, se previene la entrada de calcio, disminuyendo la activación y estabilización de factores de transcripción sensibles a calcio, asociados a la transcripción de STOC, genes de proliferación celular de remodelamiento. En terminos fisiológicos, esto se traduce una reduccion del aumento de la RVSP y del remodelamiento vascular pulmonar.

### **5.3 Determinar los efectos de Tempol, un mimético de la SOD, sobre la expresión de STOC a nivel pulmonar, la vasoconstricción pulmonar y remodelamiento vascular pulmonar.**

En este objetivo probamos los efectos cardiopulmonares de un tratamiento con TEMPOL, un mimético de SOD, en un modelo de hipertensión pulmonar inducida por CIH. Los animales tratados por 14 días con TEMPOL presentaron una reversión parcial del remodelamiento vascular pulmonar, sumado a reversión de la contracción a concentraciones crecientes de endotelina-1. Además el tratamiento con Tempol previno parcialmente el aumento de la sobreexpresión pulmonar génica relativa de TRPC1 y TRPC4, subunidades formadoras de STOC inducidas por exposición a CIH. Por otra parte, el uso de Tempol, redujo el estrés oxidativo a nivel sistémico, pero no a nivel pulmonar.

Existe evidencia que sugiere que el daño oxidativo mediado por ROS juega un papel importante en el desarrollo de la HP. ROS modula positivamente diferentes factores vasoconstrictores como ET-1, tromboxano y prostaciclina, los cuales actúan en el tono vascular pulmonar y en el remodelamiento vascular pulmonar (Aggarwal *et al.*, 2013; Tabima *et al.*, 2012). Estos reportes se condicen con nuestros resultados de miografía de alambre, ya que arterias pulmonares aisladas de animales tratados con Tempol presentan una menor contracción máxima a concentraciones crecientes de endotelina-1. Esto podría relacionarse a una disminución en la activación de los receptores ETA los cuales están mayoritariamente expresado en la musculatura lisa de la vasculatura pulmonar (Allahdadi *et al.*, 2005, Bosc *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2016). Esto sugiere una potencial disminución en la expresión de receptores ETA en las PASMC tal como se ha reportado en arterias mesentéricas y pulmonares para este modelo de hipoxia (Bosc *et al.*, 2010; Allahdadi *et al.*, 2005, Wang *et*

*al.*, 2016) y en una reducción en la señalización río abajo de estos receptores, como por ejemplo, la vía IP3-IP3R. (De Frutos *et al.*, 2010) los que al estar disminuidos, reducirían el vaciamiento reticular, por ende disminuirían la entrada de calcio vía STOC (Castillo-Galán *et al.*, 2016, Parrau *et al.*, 2013; Weigand *et al.*, 2005). La evidencia disponible sugiere que el aumento de calcio y la vasoconstricción en respuesta a la hipoxia aguda y a ET-1 dependen parcialmente de STOC (Weigand *et al.*, 2005; Castillo-Galán *et al.*, 2016, Parrau *et al.*, 2013; Lu *et al.*, 2008), esto explicaría en parte la reducción parcial del remodelamiento y de la reducción de TRPC1 y TRPC4. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprobar esta hipótesis, como por ejemplo, determinar la expresión y niveles de enzimas y factores pro-oxidantes como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NOX4 y BMP4 que regulan positivamente tanto la activación como la expresión de STOC (Jiang *et al.*, 2014).

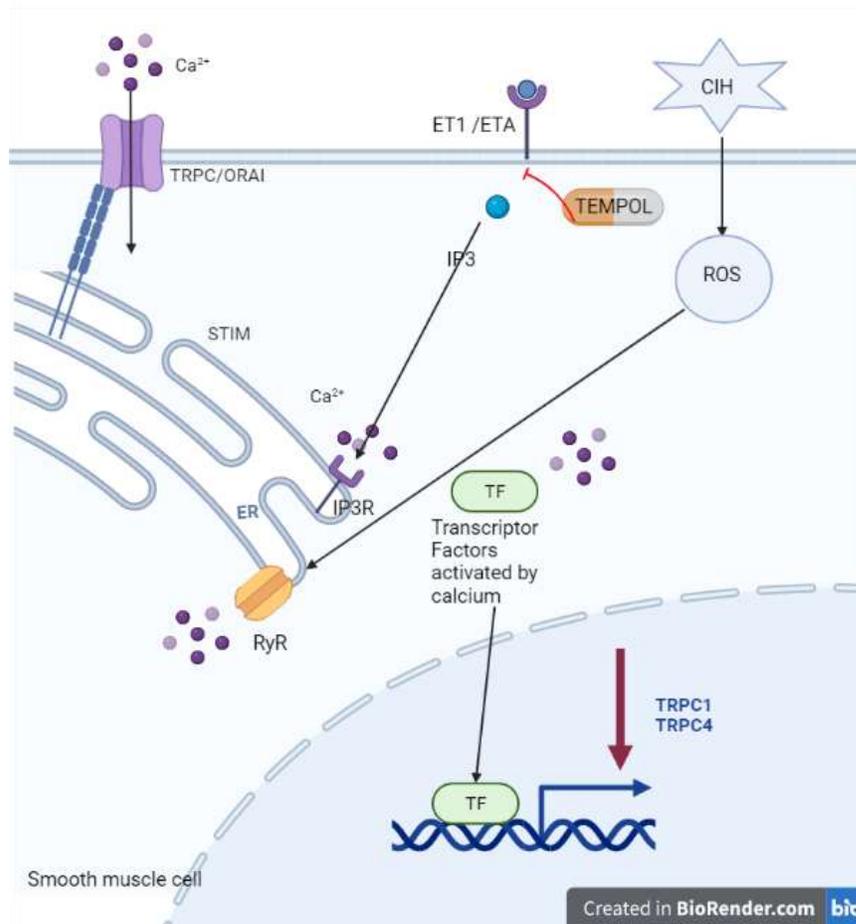
Para determinar si los efectos beneficiosos del Tempol se relacionan con un efecto anti-oxidante en nuestro modelo, determinamos los niveles séricos y pulmonares de malondialdehído (MDA) un marcador de la peroxidación lipídica y 3-NT, un marcador de nitración proteica. Tempol es un mimético de la SOD el cual puede catalizar la conversión de O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La enzima superóxido dismutasa (SOD) protege a las células de los potenciales daños causado por los radicales superóxidos, catalizando la conversión del O<sub>2</sub><sup>-</sup> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wassmann *et al.*, 2004). En este estudio la administración de Tempol logró revertir los niveles séricos de estrés oxidativo, no así el estrés oxidativo a nivel pulmonar. Por lo que no podemos atribuir un efecto anti-oxidante a nivel pulmonar. Estudios previos de ratas expuestas hipoxia sostenida por 4 semanas (Jerningan *et al.*, 2017) y expuestas por 4 semanas a CIH (Snow *et al.*, 2020), han demostrado que el uso de Tempol reduce el estrés oxidativo a nivel pulmonar junto a la RVSP y la contractibilidad a endotelina-1. Sin embargo, en estos estudios

a los animales se les entregó una solución de Tempol (1 mM) en agua, la cual fue ingerida 5 a 6 días antes de ser sometidos a hipoxia. La concentración que usamos en nuestro estudio fue de 30 mg/kg/día, lo que es menor en concentración usada en los estudios mencionados. Cabe destacar que en los estudios mencionados anteriormente y en estudios en los que se les ha administrado un antioxidante a ratas expuestas a CIH por 21 días, como melatonina (Jin *et al.*, 2016) o procyanidina (Jin *et al.*, 2014), el tratamiento ha sido entregado una semana previa a la exposición al estrés hipóxico y se mantiene durante todo el estudio. Esto podría explicar el por qué nuestro modelo no presentó una reversión del estrés oxidativo a nivel pulmonar. En conclusión estos resultados sugieren que la prevención parcial del remodelamiento vascular pulmonar, podría ser debido a una disminución en la activación y de la expresión de STOC.

#### **Limitaciones del objetivo y proyecciones.**

Debido al estallido social ocurrido el 18 de octubre del 2019 y siguiente crisis sanitaria por la pandemia mundial de SARS-COV2, nos fue imposible completar a cabalidad el estudio de este fármaco. Se propone estudiar en el futuro:

- 1) El efecto de Tempol (30 mg/kg/día) en animales sometidos a CIH y controles sobre i) la presión ventricular sistólica derecha y la frecuencia cardíaca, ii) otros marcadores de estrés oxidativo y iii) los niveles proteicos de los receptores de endotelina (ETA y ETB) en cortes de tejido pulmonar.**
- 2) Probar el efecto de una tasa de liberación mayor de Tempol (100 mg/kg/día) sobre las variables anteriormente descritas en animales controles y CIH**
- 3) Determinar la localización de las subunidades de STOC en cortes de tejido pulmonar.**



**Figura 34. Modelo especulativo de la acción de Tempol (30 mg/kg/día) en animales expuestos a CIH.** La administración de Tempol redujo en arterias pulmonares aisladas, la contracción máxima a ET-1, lo que es compatible con una reducción en los niveles de ETA. Un menor nivel de receptores ETA produciría una menor liberación de IP3 y subsecuente unión a IP3R, provocando una menor liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico. Esto podría inducir una reducción en la activación de STOC. Por otra parte, la concentración de Tempol (30 mg/kg/día) usada en esta tesis no disminuye los niveles de estrés oxidativo en el pulmón. Sin embargo, a pesar de eso, se observa que Tempol previene el aumento génico de TRPC1 y TRPC4. Por ende los efectos parciales en la reducción del remodelamiento vascular pulmonar inducidos por Tempol, podrían deberse a la reducción de la activación y en los niveles de STOC.

#### **5.4 Regulación diferencial de STOC y sus posibles moduladores en hipoxia sostenida e hipoxia intermitente crónica.**

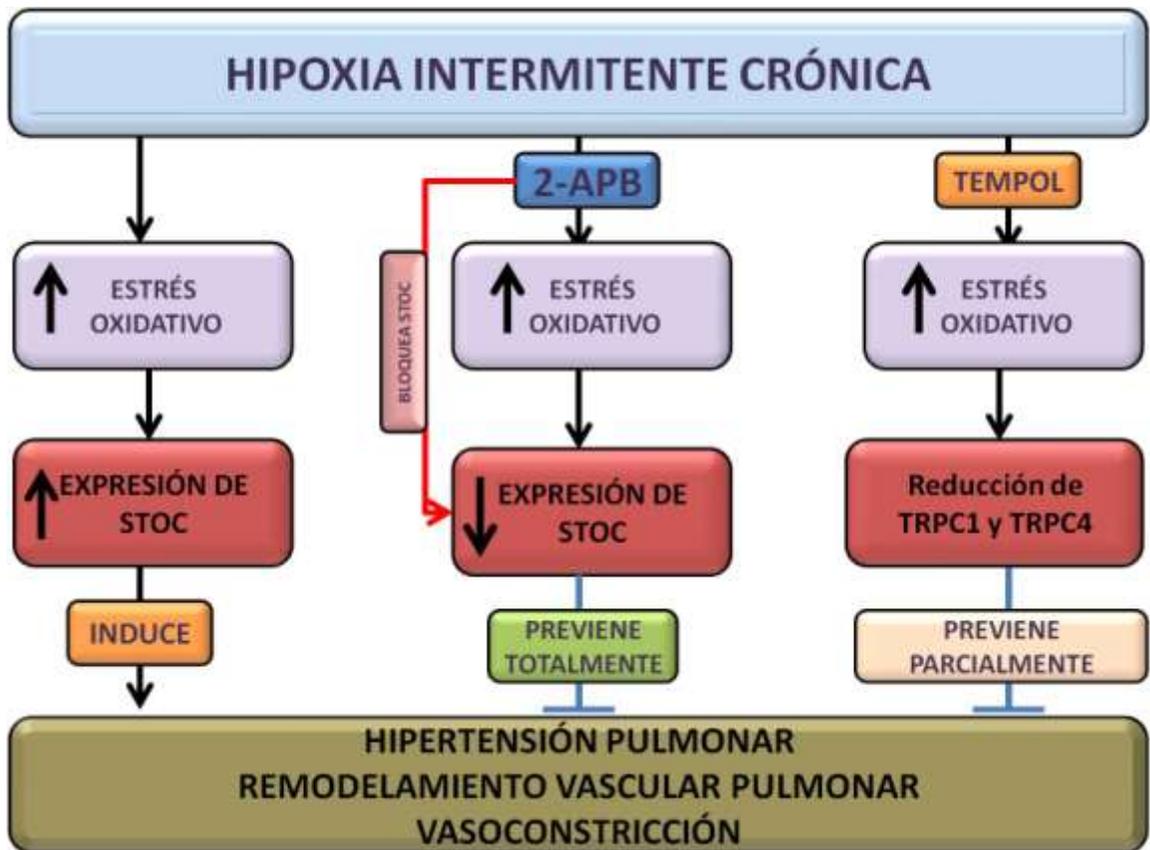
La hipoxia regula varios genes implicados en las vías moleculares relacionadas con la producción de ROS (Jiang *et al.*, 2014, Keegan, 2001), factores pro-inflamatorios (Fröhlich *et al.*, 2013), el transporte transmembrana de calcio (Lai *et al.*, 2015), la regulación de la presión arterial sistémica (Barton *et al.*, 2013) y pulmonar (Zhao, 2010). La proteína morfogenética ósea 2 (BMP2), que aumenta su expresión en el tejido pulmonar de ratas expuestas a 14d-CIH, está involucrada en la patogénesis de la HP, actuando como un factor protector regulando negativamente la expresión génica de TRPC1, TRPC4 y TRPC6 y entrada de calcio a través de STOC (Anderson *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2013). No se observaron diferencias en la expresión génica de BMP2 a los 14 días de hipoxia sostenida. Por el contrario, BMP2 mostró un aumento en la expresión génica en los pulmones de ratones expuestos a hipoxia sostenida durante 3 semanas (Frank *et al.*, 2005). De manera similar, el análisis mostró que los niveles de transcripción de PPARGC1A disminuyeron en ratas expuestas a CIH. Se ha demostrado que PPARg modula negativamente los canales STOC (Du *et al.*, 2017). Este resultado puede explicar por qué la expresión de TRPC se mantuvo sin cambios a los 14 días de CIH. Sin embargo, más estudios son necesarios para abordar la expresión temporal de BMP2 y PPARg durante la hipoxia intermitente y sostenida y su relación con la expresión de STOC. Por otro lado, CIH aumenta la formación de ROS promoviendo la activación de la vía del factor nuclear  $\kappa\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ) (Williams y Scharf, 2007). La actividad de NF- $\kappa\beta$  aumenta después de 21 días de hipoxia en los pulmones de los ratones, siendo un objetivo relevante en la remodelación vascular pulmonar (Patel *et al.*, 2017). La hipoxia también induce la translocación nuclear de NF- $\kappa\beta$  en PASMC (BelAiba *et al.*, 2007). Nuestros resultados

muestran que el nivel de transcripción de *Orai1* es más alto en los pulmones de rata expuestos a CIH durante 14 días que en el grupo de control normóxico. *SOD2* muestra niveles de transcripción diferencial a los 14 días de hipoxia sostenida e intermitente. Sin embargo, las ratas expuestas a 21 días de hipoxia sostenida no mostraron diferencias en los niveles de *SOD2* en el tejido pulmonar (Wei *et al.*, 2008). Por otro lado, la *SOD2* está disminuida en un modelo de ratones AOS (Fu *et al.*, 2020); y su disminución agrava la hipoxia crónica intermitente y la inflamación pulmonar (Song *et al.*, 2020), lo que sugiere otro objetivo terapéutico para el daño pulmonar inducido por CIH. Estos resultados sugieren que los animales expuestos a CIH presentan un elevado patrón de expresión temprana a la regulación de genes involucrados en la regulación de STOC, que los animales expuestos a SH.

## 6. CONCLUSIÓN

Se propuso la hipótesis que la hipoxia intermitente produce un aumento progresivo de los niveles de los canales “TRPC-ORAI activados por STIM (STOC)”, los cuales contribuyen a la remodelación vascular y al desarrollo de hipertensión pulmonar, siendo un mecanismo independiente del estrés oxidativo. Los resultados experimentales indican que la sobreexpresión de los STOC comienza a los 14 días de exposición a CIH, tiempo en que aún no se establece la hipertensión pulmonar y el remodelamiento vascular patológico. A partir de los 21 días de exposición a CIH se produce un aumento significativo de RVSP y del remodelamiento vascular. Por otra parte, los animales tratados con 2-APB a partir de los 14 días de CIH, no presentaron un aumento en la RVSP y el remodelamiento vascular, sin prevenir el estrés oxidativo a nivel pulmonar, sugiriendo que los canales STOC están involucrados en el desarrollo de la hipertensión pulmonar inducida por CIH y estos cambios son independientes del estrés oxidativo. A su vez, el tratamiento con Tempol, previno parcialmente la remodelación vascular y la disfunción vascular inducida por CIH. Sin embargo, el Tempol a la taza usada (30 mg/Kg/día) no redujo el estrés oxidativo a nivel pulmonar, pero abolió el aumento de las subunidades de STOC, TRPC1 y TRPC 4. Estos resultados sugieren que los cambios en el remodelamiento vascular pulmonar inducido por Tempol, podrían asociarse a una disminución en la expresión génica de las subunidades de STOC y no a la disminución del estrés oxidativo.

En resumen, los resultados indican que 2-APB previene las alteraciones vasculares pulmonares inducidas por CIH, lo que sugiere que los inhibidores de STOC podrían ser usados potencialmente para tratar la hipertensión pulmonar inducida por AOS. Sin embargo, es necesario estudiar los efectos sistémicos que podría provocar el bloqueo de los STOC y estudiar si el bloqueo de estos canales puede no solo prevenir, si no que revertir la hipertensión pulmonar inducida por AOS.



**Figura 35. Resumen.**

La exposición a CIH establece estrés oxidativo junto a un aumento progresivo en los niveles de STOC, que aumentan paralelamente a la RVSP y el remodelamiento vascular pulmonar. El tratamiento con 2-APB, un bloqueador de STOC, no redujo el estrés oxidativo a nivel pulmonar, pero produjo una reducción en la expresión génica de subunidades TRPC1, TRPC4 y TRPC6. A su vez, este tratamiento previno el aumento de la RVSP y el remodelamiento vascular pulmonar. El tratamiento con Tempol, un mimético de la SOD, redujo el estrés oxidativo a nivel sistémico, pero no a nivel pulmonar. Tempol redujo la contracción máxima a ET-1 junto a la expresión de subunidades TRPC1 y TRPC4.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abud, E. M., Maylor, J., Udem, C., Punjabi, A., Zaiman, A. L., Myers, A. C., & Shimoda, L. A. (2012). Digoxin inhibits development of hypoxic pulmonary hypertension in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), 1239-1244.
2. Aggarwal, S., Gross, C. M., Sharma, S., Fineman, J. R., & Black, S. M. (2013). Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling. *Comprehensive Physiology*, 3(3), 1011.
3. Alicia, S., Angélica, Z., Carlos, S., Alfonso, S., & Vaca, L. (2008). STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts. *Cell calcium*, 44(5), 479-491.
4. Allahdadi, K. J., Cherng, T. W., Pai, H., Silva, A. Q., Walker, B. R., Nelin, L. D., & Kanagy, N. L. (2008). Endothelin type A receptor antagonist normalizes blood pressure in rats exposed to eucapnic intermittent hypoxia. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 64(1), H434.
5. Ambudkar, I. S., de Souza, L. B., & Ong, H. L. (2017). TRPC1, Orai1, and STIM1 in SOCE: friends in tight spaces. *Cell calcium*, 63, 33-39.
6. Anderson, L., Lowery, J. W., Frank, D. B., Novitskaya, T., Jones, M., Mortlock, D. P., & de Caestecker, M. P. (2010). Bmp2 and Bmp4 exert opposing effects in hypoxic

- pulmonary hypertension. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298(3), R833-R842.
7. Barton, C. H., Ni, Z., & Vaziri, N. D. (2003). Blood pressure response to hypoxia: role of nitric oxide synthase. *American journal of hypertension*, 16(12), 1043-1048.
  8. BelAiba, R. S., Bonello, S., Zähringer, C., Schmidt, S., Hess, J., Kietzmann, T., & Görlach, A. (2007). Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor  $\kappa$ B in pulmonary artery smooth muscle cells. *Molecular biology of the cell*, 18(12), 4691-4697.
  9. Bootman, M. D., Collins, T. J., Mackenzie, L., Roderick, H. L., Berridge, M. J., & Peppiatt, C. M. (2002). 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry but an inconsistent inhibitor of InsP<sub>3</sub>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *The FASEB Journal*, 16(10), 1145-1150.
  10. Bosc, L. V. G., Resta, T., Walker, B., & Kanagy, N. L. (2010). Mechanisms of intermittent hypoxia induced hypertension. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(1-2), 3-17.5.
  11. Bosc, L. V. G., Resta, T., Walker, B., & Kanagy, N. L. (2010). Mechanisms of intermittent hypoxia induced hypertension. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(1-2), 3-17.
  12. Brusselmans, K., Compernelle, V., Tjwa, M., Wiesener, M. S., Maxwell, P. H., Collen, D., & Carmeliet, P. (2003). Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *The Journal of clinical investigation*, 111(10), 1519-1527.

13. Castillo-Galán, S., Arenas, G. A., Reyes, R. V., Krause, B. J., & Iturriaga, R. (2020). Stim- activated TRPC-ORAI channels in pulmonary hypertension induced by chronic intermittent hypoxia. *Pulmonary Circulation*, 10: 13-22.
14. Castillo-Galán, S., Quezada, S., Moraga, F., Ebensperger, G., Herrera, E. A., Beñaldo, F. & Reyes, R. V. (2016). 2-Aminoethyl-diphenylborinate modifies the pulmonary circulation in pulmonary hypertensive newborn lambs partially gestated at high altitude. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 311(4), L788-L799.
15. Chen, C. Y., Del Gatto-Konczak, F., Wu, Z., & Karin, M. (1998). Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Science*, 280(5371), 1945-1949.
16. Chen, T. X., Xu, X. Y., Zhao, Z., Zhao, F. Y., Gao, Y. M., Yan, X. H., & Wan, Y. (2017). Hydrogen peroxide is a critical regulator of the hypoxia-induced alterations of store-operated Ca<sup>2+</sup> entry into rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 312(4), L477-L487.
17. Clough E & Barrett T. (2016). The Gene Expression Omnibus Database. *Methods in molecular biology*. 1418: 93-110.
18. Compornolle, V., Brusselmans, K., Acker, T., Hoet, P., Tjwa, M., Beck, H., & Nemery, B. (2002). Loss of HIF-2 $\alpha$  and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nature medicine*, 8:702.
19. Cowburn, A. S., Crosby, A., Macias, D., Branco, C., Colaço, R., Southwood, M., & Johnson, R. S. (2016). Pulmonary endothelial HIF-2 $\alpha$ -arginase axis plays an essential

- role in the development of hypoxia pulmonary hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(31), 8801-8806.
20. Cracowski, J. L., Cracowski, C., Bessard, G., Pepin, J. L., Bessard, J., Schwebel, C., & Pison, C. (2001). Increased lipid peroxidation in patients with pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 164(6), 1038-1042.
  21. Del Rio, R., Andrade, D. C., Lucero, C., Arias, P., & Iturriaga, R. (2016). Carotid body ablation abrogates hypertension and autonomic alterations induced by intermittent hypoxia in rats. *Hypertension*, 68(2), 436-445.
  22. Del Rio, R., Moya, E. A., & Iturriaga, R. (2010). Carotid body and cardiorespiratory alterations in intermittent hypoxia: the oxidative link. *European Respiratory Journal*, 36(1), 143-150.
  23. Delaey, C., Boussey, K., & Van de Voorde, J. (2002). Contractility Studies on Isolated Bovine Choroidal Small Arteries: Determination of the Active and Passive Wall Tension–Internal Circumference Relation. *Experimental eye research*, 75(3), 243-248.
  24. Dempsey, J. A., Veasey, S. C., Morgan, B. J., & O'Donnell, C. P. (2010). Pathophysiology of sleep apnea. *Physiological reviews*, 90(1), 47-112.
  25. Dolmetsch, R. E., Lewis, R. S., Goodnow, C. C., & Healy, J. I. (1997). Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature*, 386(6627), 855-858.
  26. Domínguez-Rodríguez, A., Ruiz-Hurtado, G., Sabourin, J., Gómez, A. M., Alvarez, J. L., & Benitah, J. P. (2015). Proarrhythmic effect of sustained EPAC activation on TRPC3/4

- in rat ventricular cardiomyocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 87, 74-78.
27. Du, Y., Fu, J., Yao, L., Qiao, L., Liu, N., Xing, Y., & Xue, X. (2017). Altered expression of PPAR- $\gamma$  and TRPC in neonatal rats with persistent pulmonary hypertension. *Molecular medicine reports*, 16(2), 1117-1124.
28. Dunham-Snary, K. J., Wu, D., Sykes, E. A., Thakrar, A., Parlow, L. R., Mewburn, J. D., & Archer, S. L. (2017). Hypoxic pulmonary vasoconstriction: from molecular mechanisms to medicine. *Chest*, 151(1), 181-192.
29. Eguchi, H., Ikuta, T., Tachibana, T., Yoneda, Y., & Kawajiri, K. (1997). A nuclear localization signal of human aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator/hypoxia-inducible factor 1 $\beta$  is a novel bipartite type recognized by the two components of nuclear pore-targeting complex. *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17640-17647.
30. Fletcher, E. C., Lesske, J., Behm, R., Miller, C. C., Stauss, H., & Unger, T. (1992). Carotid chemoreceptors, systemic blood pressure, and chronic episodic hypoxia mimicking sleep apnea. *Journal of applied physiology*, 72(5), 1978-1984.
31. Floras J. S. (2018). Sleep Apnea and Cardiovascular Disease: An Enigmatic Risk Factor. *Circulation research*, 122(12), 1741–1764.
32. Frank, D. B., Abtahi, A., Yamaguchi, D. J., Manning, S., Shyr, Y., Pozzi, A., & De Caestecker, M. P. (2005). Bone morphogenetic protein 4 promotes pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension. *Circulation research*, 97(5), 496-504.
33. Fröhlich, S., Boylan, J., & McLoughlin, P. (2013). Hypoxia-induced inflammation in the lung: a potential therapeutic target in acute lung injury?. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 48(3), 271-279.

34. Fu, C., Hao, S., Liu, Z., Xie, L., Wu, X., Wu, X., & Li, S. (2020). SOD2 ameliorates pulmonary hypertension in a murine model of sleep apnea via suppressing expression of NLRP3 in CD11b+ cells. *Respiratory research*, 21(1), 1-14.
35. Fuchs, B., Dietrich, A., Gudermann, T., Kalwa, H., Grimminger, F., & Weissmann, N. (2010). The role of classical transient receptor potential channels in the regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction. In *Membrane Receptors, Channels and Transporters in Pulmonary Circulation* (pp. 187-200). Humana Press, Totowa, NJ.
36. Galiè, N., Palazzini, M., Leci, E., & Manes, A. (2010). Current therapeutic approaches to pulmonary arterial hypertension. *Revista Española de Cardiología (English Edition)*, 63(6), 708-724.
37. Golovina, V. A., Platoshyn, O., Bailey, C. L., Wang, J., Limsuwan, A., Sweeney, M., & Yuan, J. X. J. (2001). Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 280: H746-H755.
38. Gozal, D., & Kheirandish-Gozal, L. (2008). Cardiovascular morbidity in obstructive sleep apnea: oxidative stress, inflammation, and much more. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 177(4): 369-375.
39. Guibert, C., Ducret, T., & Savineau, J. P. (2011). Expression and physiological roles of TRP channels in smooth muscle cells. *Transient receptor potential channels*, 687-706.
40. Guzy, R. D., & Schumacker, P. T. (2006). Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Experimental physiology*, 91(5), 807-819.

41. Harki, O., Boete, Q., Pépin, J. L., Arnaud, C., Belaidi, E., Faury, G., & Briançon-Marjollet, A. (2021). Intermittent hypoxia-related alterations in vascular structure and function: a systematic review and meta-analysis of rodent data. *European Respiratory Journal*.
42. Hawkins, B. J., Irrinki, K. M., Mallilankaraman, K., Lien, Y. C., Wang, Y., Bhanumathy, C. D., & Kurosaki, T. (2010). S-glutathionylation activates STIM1 and alters mitochondrial homeostasis. *The Journal of cell biology*, 190(3), 391-405.
43. He, X., Song, S., Ayon, R. J., Balisterieri, A., Black, S. M., Makino, A., & Yuan, J. X. J. (2018). Hypoxia selectively upregulates cation channels and increases cytosolic [Ca<sup>2+</sup>] in pulmonary, but not coronary, arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 314(4), C504-C517.
44. Herrera, E. A., Macchiavello, R., Montt, C., Ebensperger, G., Díaz, M., Ramírez, S., & Llanos, A. J. (2014). Melatonin improves cerebrovascular function and decreases oxidative stress in chronically hypoxic lambs. *Journal of pineal research*, 57(1), 33-42.
45. Herrera, E. A., Riquelme, R. A., Ebensperger, G., Reyes, R. V., Ulloa, C. E., Cabello, G., & Llanos, A. J. (2010). Long-term exposure to high-altitude chronic hypoxia during gestation induces neonatal pulmonary hypertension at sea level. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 299(6), R1676-R1684.
46. Hou, X., Chen, J., Luo, Y., Liu, F., Xu, G., & Gao, Y. (2013). Silencing of STIM1 attenuates hypoxia-induced PSMCs proliferation via inhibition of the SOC/Ca<sup>2+</sup>/NFAT pathway. *Respiratory research*, 14: 2.

47. Huang, G. N., Zeng, W., Kim, J. Y., Yuan, J. P., Han, L., Muallem, S., & Worley, P. F. (2006). STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I crac and TRPC1 channels. *Nature cell biology*, 8(9), 1003.
48. Humbert, M., Sitbon, O., & Simonneau, G. (2004). Treatment of pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine*, 351(14), 1425-1436.
49. Hussain, A., Suleiman, M. S., George, S. J., Loubani, M., & Morice, A. (2017). Hypoxic pulmonary vasoconstriction in humans: tale or myth. *The open cardiovascular medicine journal*, 11: 1.
50. Iturriaga, R. (2018). Translating carotid body function into clinical medicine. *The Journal of Physiology*, 596(15), 3067-3077.
51. Iturriaga, R., Alcayaga, J., Chapleau, M. W., & Somers, V. K. (2021). Carotid body chemoreceptors: physiology, pathology, and implications for health and disease. *Physiological reviews*, 101(3), 1177-1235.
52. Iturriaga, R., & Castillo-Galán, S. (2019). Potential contribution of carotid body-induced sympathetic and renin-angiotensin system overflow to pulmonary hypertension in intermittent hypoxia. *Current hypertension reports*, 21(11), 1-9.
53. Iturriaga, R., Andrade, D. C., & Del Rio, R. (2014). Enhanced carotid body chemosensory activity and the cardiovascular alterations induced by intermittent hypoxia. *Frontiers in physiology*, 5.
54. Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., & Kaelin Jr, W. G. (2001). HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*, 292(5516), 464-468.

55. Jaakkola, P., Mole, D. R., Tian, Y. M., Wilson, M. I., Gielbert, J., Gaskell, S. J., & Maxwell, P. H. (2001). Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292(5516), 468-472.
56. Jernigan, N. L., Naik, J. S., Weise-Cross, L., Detweiler, N. D., Herbert, L. M., Yellowhair, T. R., & Resta, T. C. (2017). Contribution of reactive oxygen species to the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *PLoS One*, 12(6), e0180455.
57. Jiang, Q., Fu, X., Tian, L., Chen, Y., Yang, K., Chen, X., & Wang, J. (2014). NOX4 mediates BMP4-induced upregulation of TRPC1 and 6 protein expressions in distal pulmonary arterial smooth muscle cells. *PLoS One*, 9(9), e107135.
58. Jiao, X., Sherman, B. T., Huang, D. W., Stephens, R., Baseler, M. W., Lane, H. C., & Lempicki, R. A. (2012). DAVID-WS: a stateful web service to facilitate gene/protein list analysis. *Bioinformatics*, 28(13), 1805-1806.
59. Jin, H., Liu, M., Zhang, X., Pan, J., Han, J., Wang, Y., & Yuan, Y. (2016). Grape seed procyanidin extract attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting oxidative stress and pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation. *The Journal of nutritional biochemistry*, 36, 81-88.
60. Jin, H., Wang, Y., Zhou, L., Liu, L., Zhang, P., Deng, W., & Yuan, Y. (2014). Melatonin attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting the inflammation and the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells. *Journal of pineal research*, 57(4), 442-450.
61. Johnstone, L. S., Graham, S. J., & Dziadek, M. A. (2010). STIM proteins: integrators of signalling pathways in development, differentiation and disease. *Journal of cellular and molecular medicine*, 14(7), 1890-1903.

62. Keegan, A. (2001). Oxidative stress and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respiratory Research*, 2(1), 1-1.
63. Krause, B. J., Casanello, P., Dias, A. C., Arias, P., Velarde, V., Arenas, G. A., & Iturriaga, R. (2018). Chronic intermittent hypoxia-induced vascular dysfunction in rats is reverted by N-acetylcysteine supplementation and arginase inhibition. *Frontiers in physiology*, 9, 901.
64. Krause, B. J., Del Rio, R., Moya, E. A., Marquez-Gutierrez, M., Casanello, P., & Iturriaga, R. (2015). Arginase–endothelial nitric oxide synthase imbalance contributes to endothelial dysfunction during chronic intermittent hypoxia. *Journal of hypertension*, 33(3), 515-524.
65. Kuhr, F. K., Smith, K. A., Song, M. Y., Levitan, I., & Yuan, J. X. (2012). New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca<sup>2+</sup> signaling. *American journal of physiology-heart and circulatory physiology*, 302(8), H1546-H1562.
66. Lai, N., Lu, W., & Wang, J. (2015). Ca<sup>2+</sup> and ion channels in hypoxia-mediated pulmonary hypertension. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(2), 1081.
67. Lavin, B., Lacerda, S., Andia, M. E., Lorrio, S., Bakewell, R., Smith, A., & Phinikaridou, A. (2020). Tropoelastin: an in vivo imaging marker of dysfunctional matrix turnover during abdominal aortic dilation. *Cardiovascular research*, 116(5), 995-1005.
68. Lievremont, J. P., Bird, G. S., & Putney, J. W. (2005). Mechanism of inhibition of TRPC cation channels by 2-aminoethoxydiphenylborane. *Molecular pharmacology*, 68(3), 758-762.

69. Liu, J. Q., Zelko, I. N., Erbynn, E. M., Sham, J. S., & Folz, R. J. (2006). Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox). *American journal of physiology-lung cellular and molecular physiology*, 290(1), L2-L10.
70. Lu, W., Kang, J., Hu, K., Tang, S., Zhou, X., Yu, S., & Xu, L. (2016). Angiotensin-(1-7) inhibits inflammation and oxidative stress to relieve lung injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *Brazilian journal of medical and biological research*, 49(10).
71. Lu, W., Wang, J., Peng, G., Shimoda, L. A., & Sylvester, J. T. (2009). Knockdown of stromal interaction molecule 1 attenuates store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and Ca<sup>2+</sup> responses to acute hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 297(1), L17-L25.
72. Lu, W., Wang, J., Shimoda, L. A., & Sylvester, J. T. (2008). Differences in STIM1 and TRPC expression in proximal and distal pulmonary arterial smooth muscle are associated with differences in Ca<sup>2+</sup> responses to hypoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 295(1), L104-L113.
73. Manalo, D. J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B. D., Shui, Q. Y., & Semenza, G. L. (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*, 105(2), 659-669.
74. Martins, F. O., Sacramento, J. F., Olea, E., Melo, B. F., Prieto-Lloret, J., Obeso, A., & Conde, S. V. (2021). Chronic intermittent hypoxia induces early-stage metabolic dysfunction independently of adipose tissue deregulation. *Antioxidants*, 10(8), 1233.
75. ME, A. S., El-Desoky, M. E., Maaty, A., Abd-ElMaksoud, A. M., & Suliman, L. A. (2013). Pulmonary hypertension in obstructive sleep apnea hypopnea syndrome. *Egyptian Journal of Chest diseases and Tuberculosis*, 62(3), 459-465.

76. Mohammadi, S., Najafi, M., Hamzeiy, H., Maleki-Dizaji, N., Pezeshkian, M., Sadeghi-Bazargani, H., & Garjani, A. (2012). Protective effects of methylsulfonylmethane on hemodynamics and oxidative stress in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Advances in pharmacological sciences*, 2012:507278.
77. Morihara, H., Obana, M., Tanaka, S., Kawakatsu, I., Tsuchiyama, D., Mori, S., & Nakayama, H. (2017). 2-aminoethoxydiphenyl borate provides an anti-oxidative effect and mediates cardioprotection during ischemia reperfusion in mice. *PloS one*, 12(12), e0189948.
78. Mottet, D., Michel, G., Renard, P., Ninane, N., Raes, M., & Michiels, C. (2003). Role of ERK and calcium in the hypoxia-induced activation of HIF-1. *Journal of cellular physiology*, 194(1), 30-44.
79. Mulvany, M. J., & Aalkjaer, C. (1990). Structure and function of small arteries. *Physiological reviews*, 70(4), 921-961.
80. Nara, A., Nagai, H., Shintani-Ishida, K., Ogura, S., Shimosawa, T., Kuwahira, I., & Yoshida, K. I. (2015). Pulmonary arterial hypertension in rats due to age-related arginase activation in intermittent hypoxia. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 53(2), 184-192.
81. Ng, L. C., Wilson, S. M., & Hume, J. R. (2005). Mobilization of sarcoplasmic reticulum stores by hypoxia leads to consequent activation of capacitative  $Ca^{2+}$  entry in isolated canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *The Journal of physiology*, 563(2), 409-419.
82. Nisbet, R. E., Graves, A. S., Kleinhenz, D. J., Rupnow, H. L., Reed, A. L., Fan, T. H. M., & Hart, C. M. (2009). The role of NADPH oxidase in chronic intermittent hypoxia-

- induced pulmonary hypertension in mice. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 40(5), 601-609.
83. Ogawa, A., Firth, A. L., Smith, K. A., Maliakal, M. V., & Yuan, J. X. J. (2012). PDGF enhances store-operated Ca<sup>2+</sup> entry by upregulating STIM1/Orai1 via activation of Akt/mTOR in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 302(2), C405-C411.
84. Parrau, D., Ebensperger, G., Herrera, E. A., Moraga, F., Riquelme, R. A., Ulloa, C. E., & Reyes, R. V. (2013). Store-operated channels in the pulmonary circulation of high-and low-altitude neonatal lambs. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 304(8), L540-L548.
85. Patel, H., Zaghloul, N., Lin, K. I., Liu, S. F., Miller, E. J., & Ahmed, M. (2017). Hypoxia-induced activation of specific members of the NF-κB family and its relevance to pulmonary vascular remodeling. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 92, 141-147.
86. Peng, Y. J., Overholt, J. L., Kline, D., Kumar, G. K., & Prabhakar, N. R. (2003). Induction of sensory long-term facilitation in the carotid body by intermittent hypoxia: implications for recurrent apneas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(17), 10073-10078.
87. Prabhakar, N. R., & Semenza, G. L. (2012). Adaptive and maladaptive cardiorespiratory responses to continuous and intermittent hypoxia mediated by hypoxia-inducible factors 1 and 2. *Physiological reviews*, 92(3), 967-1003.
88. Putney, J. W. (2017). Forms and functions of store-operated calcium entry mediators, STIM and Orai. *Advances in biological regulation*.

89. Reyes, R. V., Castillo-Galán, S., Hernandez, I., Herrera, E. A., Ebensperger, G., & Llanos, A. J. (2018). Revisiting the role of TRP, orai, and ASIC channels in the pulmonary arterial response to hypoxia. *Frontiers in physiology*, 9, 486.
90. Reyes, R. V., Díaz, M., Ebensperger, G., Herrera, E. A., Quezada, S. A., Hernandez, I., & Llanos, A. J. (2018). The role of nitric oxide in the cardiopulmonary response to hypoxia in highland and lowland newborn llamas. *The Journal of physiology*, 596(23), 5907-5923.
91. Salnikow, K., Kluz, T., Costa, M., Piquemal, D., Demidenko, Z. N., Xie, K., & Blagosklonny, M. V. (2002). The regulation of hypoxic genes by calcium involves c-Jun/AP-1, which cooperates with hypoxia-inducible factor 1 in response to hypoxia. *Molecular and cellular biology*, 22(6), 1734-1741.
92. Schafer, H., Hasper, E., Ewig, S., Koehler, U., Latzelsberger, J., Tasci, S., & Luderitz, B. (1998). Pulmonary haemodynamics in obstructive sleep apnoea: time course and associated factors. *European Respiratory Journal*, 12(3), 679-684.
93. Semenza, G. L. (1999). Regulation of mammalian O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annual review of cell and developmental biology*, 15(1), 551-578.
94. Semenza, G. L. (2002). HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends in molecular medicine*, 8(4), S62-S67.
95. Shao, J., Wang, P., Liu, A., Du, X., Bai, J., & Chen, M. (2016). Punicalagin prevents hypoxic pulmonary hypertension via anti-oxidant effects in rats. *The American journal of Chinese medicine*, 44(04), 785-801.

96. Shibasaki, F., Price, E. R., Milan, D., & McKeon, F. (1996). Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4. *Nature*, 382(6589), 370-373.
97. Shimoda, L. A., & Semenza, G. L. (2011). HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183(2), 152-156.
98. Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., & Souza, R. (2019). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, 53(1).
99. Smith, K. A., Voiriot, G., Tang, H., Fraidenburg, D. R., Song, S., Yamamura, H., & Yuan, J. X. J. (2015). Notch activation of Ca<sup>2+</sup> signaling in the development of hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 53(3), 355-367.
100. Snow, J. B., Norton, C. E., Sands, M. A., Weise-Cross, L., Yan, S., Herbert, L. M., & Resta, T. C. (2020). Intermittent Hypoxia Augments Pulmonary Vasoconstrictor Reactivity through PKC $\beta$ /Mitochondrial Oxidant Signaling. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 62(6), 732-746.
101. Somers, V. K., White, D. P., Amin, R., Abraham, W. T., Costa, F., Culebras, A., & Pickering, T. G. (2008). Sleep apnea and cardiovascular disease: An american heart association/american college of cardiology foundation scientific statement from the american heart association council for high blood pressure research professional education committee, council on clinical cardiology, stroke council, and council on cardiovascular nursing in collaboration with the national heart, lung, and blood institute

- national center on sleep disorders research (national institutes of health). *Circulation*, 118(10), 1080-1111.
102. Sommer, N., Strielkov, I., Pak, O., & Weissmann, N. (2015). Oxygen sensing and signal transduction in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *European Respiratory Journal*, 47(1):288-303.
103. Song, J. Q., Jiang, L. Y., Fu, C. P., Wu, X., Liu, Z. L., Xie, L., & Li, S. Q. (2020). Heterozygous SOD2 deletion deteriorated chronic intermittent hypoxia-induced lung inflammation and vascular remodeling through mtROS-NLRP3 signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(9), 1197-1207.
104. Suresh, K., & Shimoda, L.A. (2016). Lung Circulation. *Comprehensive Physiology* 6: 897 – 943.
105. Sylvester, J. T., Shimoda, L. A., Aaronson, P. I., & Ward, J. P. (2012). Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiological reviews*, 92(1), 367-520.
106. Tabima, D. M., Frizzell, S., & Gladwin, M. T. (2012). Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radical Biology and Medicine*, 52(9), 1970-1986.
107. Timmerman, L. A., Clipstone, N. A., Ho, S. N., Northrop, J. P., & Crabtree, G. R. (1996). Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca<sup>2+</sup> signals and immunosuppression. *Nature*, 383(6603), 837-840.
108. Waldron, R. T., Chen, Y., Pham, H., Go, A., Su, H. Y., Hu, C., & Pandolf, S. J. (2019). The Orai Ca<sup>2+</sup> channel inhibitor CM4620 targets both parenchymal and immune cells to reduce inflammation in experimental acute pancreatitis. *The Journal of physiology*, 597(12), 3085-3105.

109. Wan, J., Yamamura, A., Zimnicka, A. M., Voiriot, G., Smith, K. A., Tang, H., & Yuan, J. X. J. (2013). Chronic hypoxia selectively enhances L-and T-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1. 2 and Cav3.2. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 305(2), L154-L164.
110. Wang, J. W., Li, A. Y., Guo, Q. H., Guo, Y. J., Weiss, J. W., & Ji, E. S. (2016). Endothelin-1 and ET receptors impair left ventricular function by mediated coronary arteries dysfunction in chronic intermittent hypoxia rats. *Physiological reports*, 5(1), e13050.
111. Wang, J., Fu, X., Yang, K., Jiang, Q., Chen, Y., Jia, J., & Zhong, N. (2015). Hypoxia inducible factor-1-dependent up-regulation of BMP4 mediates hypoxia-induced increase of TRPC expression in PASMCs. *Cardiovascular research*, 107(1), 108-118.
112. Wang, J., Shimoda, L. A., & Sylvester, J. T. (2012). Ca<sup>2+</sup> responses of pulmonary arterial myocytes to acute hypoxia require release from ryanodine and inositol trisphosphate receptors in sarcoplasmic reticulum. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 303(2), L161-L168.
113. Wang, J., Weigand, L., Lu, W., Sylvester, J. T., Semenza, G. L., & Shimoda, L. A. (2006). Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca<sup>2+</sup> in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circulation research*, 98(12), 1528-1537.
114. Wang, J., Xu, C., Zheng, Q., Yang, K., Lai, N., Wang, T., & Lu, W. (2017). Orai1, 2, 3 and STIM1 promote store-operated calcium entry in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Cell death discovery*, 3(1), 1-11.

115. Ward, J. P., & McMurtry, I. F. (2009). Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction and their roles in pulmonary hypertension: new findings for an old problem. *Current opinion in pharmacology*, 9(3), 287-296.
116. Wassmann, S., Wassmann, K., & Nickenig, G. (2004). Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension*, 44(4), 381-386.
117. Waypa, G. B., Marks, J. D., Mack, M. M., Boriboun, C., Mungai, P. T., & Schumacker, P. T. (2002). Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes. *Circulation research*, 91(8), 719-726.
118. Wei, H. L., Zhang, C. Y., Jin, H. F., Tang, C. S., & Du, J. B. (2008). Hydrogen sulfide regulates lung tissue-oxidized glutathione and total antioxidant capacity in hypoxic pulmonary hypertensive rats. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(6), 670-676.
119. Weigand, L., Foxson, J., Wang, J., Shimoda, L. A., & Sylvester, J. T. (2005). Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by antagonists of store-operated Ca<sup>2+</sup> and nonselective cation channels. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 289(1), L5-L13. 304(8), L540-L548
120. Williams, A., & Scharf, S. M. (2007). Obstructive sleep apnea, cardiovascular disease, and inflammation—is NF-κB the key?. *Sleep and Breathing*, 11(2), 69-76.
121. Wray, S., & Burdyga, T. (2010). Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiological reviews*, 90(1), 113-178.

122. Wu, W., Dave, N. B., Yu, G., Strollo, P. J., Kovkarova-Naumovs.ki, E., Ryter, S. W., & Kaminski, N. (2008). Network analysis of temporal effects of intermittent and sustained hypoxia on rat lungs. *Physiological genomics*, 36(1), 24-34.
123. Yang, C. H., Zhuang, W. L., Shen, Y. J., Lai, C. J., & Kou, Y. R. (2016). NADPH oxidase-derived ROS induced by chronic intermittent hypoxia mediates hypersensitivity of lung vagal C fibers in rats. *Frontiers in physiology*, 7, 166.
124. Yang, X. R., Lin, M. J., & Sham, J. S. (2010). Physiological functions of transient receptor potential channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. In *Membrane Receptors, Channels and Transporters in Pulmonary Circulation* (pp. 109-122). Humana Press, Totowa, NJ.
125. Young, T., Palta, M., Dempsey, J., Skatrud, J., Weber, S., & Badr, S. (1993). The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults. *New England Journal of Medicine*, 328(17), 1230-1235.
126. Yu, Aimee. Y., Shimoda, L. A., Iyer, N. V., Huso, D. L., Sun, X., McWilliams, R., & Semenza, G. L. (1999). Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *The Journal of clinical investigation*, 103(5), 691-696.
127. Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(3), 337-349.
128. Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.

129. Zhang, W. M., Yip, K. P., Lin, M. J., Shimoda, L. A., Li, W. H., & Sham, J. S. (2003). ET-1 activates Ca<sup>2+</sup> sparks in PASMC: local Ca<sup>2+</sup> signaling between inositol trisphosphate and ryanodine receptors. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285(3), L680-L690.
130. Zhang, X., Rui, L., Wang, M., Lian, H., & Cai, L. (2018). Sinomenine Attenuates Chronic Intermittent Hypoxia-Induced Lung Injury by Inhibiting Inflammation and Oxidative Stress. *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 1574.
131. Zhang, Y., Lu, W., Yang, K., Xu, L., Lai, N., Tian, L., & Wang, J. (2013). Bone morphogenetic protein 2 decreases TRPC expression, store-operated Ca<sup>2+</sup> entry, and basal [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat distal pulmonary arterial smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 304(9), C833-C843.
132. Zhao, L. (2010). Chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat: the best animal model for studying pulmonary vasoconstriction and vascular medial hypertrophy. *Drug discovery today: disease models*, 7(3-4), 83-88.