

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



**MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y
ESTRUCTURA PULMONAR EN RATAS EXPUESTAS A HIPOXIA
INTERMITENTE.**

JORGE ANTONIO RODRÍGUEZ BORGES

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN FISIOPATOLOGÍA**

Directores de Tesis: Profs. Dr. EMILIO HERRERA VIDELA
Dr. RODRIGO CASTILLO PEÑALOZA

2018

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE MEDICINA

ESCUELA DE POSTGRADO



“MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTRUCTURA PULMONAR EN RATAS EXPUESTAS A HIPOXIA INTERMITENTE”.

JORGE ANTONIO RODRÍGUEZ BORGES

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN FISIOPATOLOGÍA**

Directores de Tesis: Profs. Dr. EMILIO HERRERA VIDELA
Dr. RODRIGO CASTILLO PEÑALOZA

2018



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato:

JORGE ANTONIO RODRIGUEZ BORGES

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en FISIOPATOLOGÍA en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 9 agosto de 2018.

Profs. Dr. EMILIO HERRERA VIDELA Dr. RODRIGO CASTILLO PEÑALOZA
Directores de Tesis
FACULTAD DE MEDICINA

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. EMILIA SANHUEZA REINOSO Prof. Dra. TATIANA REYES RUBIO

Prof. Dr. MAURICIO HENRÍQUEZ LUNA.
Presidente Comisión

DEDICATORIA:

A mi esposa Baldramina, mi amiga y confidente. Por su paciencia, amor y compañía. Por las noches en vela trabajando al lado mío. Y por estimular constantemente en mí, nuevos desafíos y deseos de aprender.

AGRADECIMIENTOS

A mis hijos, Jorge y Cristóbal, que en múltiples ocasiones me tendieron una mano en esta iniciativa. A los profesionales del Laboratorio de Función y Reactividad Vascular del ICBM, Facultad de Medicina Oriente, U de Chile, dirigido por el Dr. Emilio Herrera, a mi co-tutor de tesis Dr. Rodrigo Castillo, al Dr. Alejandro González (BQ). A Miguel Aguilar, mi compañero en el Magíster y a los que de una u otra forma, contribuyeron en los logros alcanzados.

INDICE

| | |
|---|----|
| RESUMEN | 7 |
| ABSTRACT | 9 |
| INTRODUCCIÓN | 11 |
| HIPÓTESIS | 17 |
| OBJETIVO GENERAL | 18 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 18 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 19 |
| Obtención de Muestras | 20 |
| Biología Molecular | 21 |
| Histomorfología | 27 |
| Análisis Estadístico | 28 |
| RESULTADOS | |
| Hipoxia Hipobárica Intermitente Aguda (HIA) | 29 |
| Hipoxia Hipobárica Intermitente Crónica (HIC) | 47 |
| DISCUSIÓN | 62 |
| CONCLUSIONES | 72 |
| RELEVANCIA Y PERSPECTIVAS | 72 |
| PRODUCTIVIDAD CIENTIFICA | 73 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 75 |

RESUMEN

La exposición a gran altitud geográfica (> 2500 msnm) genera hipoxia hipobárica, lo que induce una respuesta vasoconstrictora pulmonar hipóxica (VPH). La VPH crónica se ha asociado a estrés oxidativo (EO), remodelamiento vascular y en ocasiones, hipertrofia del ventrículo derecho, lo que podría derivar en hipertensión arterial pulmonar (HAP).

Durante las últimas décadas, el desarrollo de la minería en Chile se ha sustentado en la explotación en faenas sobre los 4000 msnm, donde existen turnos laborales de 4, 7 o más días en altitud con descanso de igual cuantía a nivel del mar, comprometiendo a más de 60.000 trabajadores. A pesar del monitoreo médico de los trabajadores mineros, no se tiene un conocimiento acabado acerca de los mecanismos involucrados en las respuestas pulmonares a corto y largo plazo. Investigaciones en modelos animales permiten realizar estudios mas acabados de mecanismos fisiopatológicos tras exponerlos *in vivo* a un ambiente hipobárico. En esta Tesis se propusieron las siguientes hipótesis: a) Hipoxia intermitente (HI) de corta duración no produce EO, ni remodelamiento vascular pulmonar, pero sí aumento de expresión y actividad de enzimas antioxidante (AO) y HIF 1 y 2; y b) HI crónica produce EO y remodelamiento vascular pulmonar, junto a una mayor expresión y actividad de enzimas AO y HIF 1 y 2. Se utilizaron ratas Wistar machos adultos, expuestas a una altura simulada de 4.600 m, equivale a 428 torr, por 4 d y luego a 750 torr (~nivel de mar) por 4 d, lo que equivale a un ciclo de exposición. Estas se dividieron en 4 grupos: 2 grupos hipóxicos expuestos a 4 y 12 ciclos, definidos como hipoxia hipobárica intermitente aguda (HIA) y crónica (HIC), respectivamente, los cuales se compararon con 2 grupos controles de edad equivalente mantenidos en normoxia. HIA presentó un aumento de la actividad de catalasa (CAT), disminución de glutatión peroxidasa, aumento de EO y remodelamiento de arterias pequeñas (mayor espesor de la capa muscular y menor diámetro del lumen). En contraste, HIC tuvo disminución de la actividad CAT, aumento de EO y remodelamiento vascular de arterias medianas y grandes (mayor

espesor de la capa muscular y adventicia). En este estudio concluimos que la hipoxia hipobárica intermitente induce remodelamiento vascular, estrés oxidativo y cambios en el balance oxidativo, dependientes del tiempo de exposición a altura. Este estudio aporta al conocimiento sobre los efectos pulmonares de la hipobaría en turnos laborales.

ABSTRACT

Exposure to high altitude (> 2500 masl) induces hypobaric hypoxia, with a hypoxic pulmonary vasoconstrictor response (HPV). Chronic HPV determines pulmonary hypertension (PH), vascular remodeling and, ultimately, right ventricular hypertrophy, which is associated with oxidative stress (OS).

During the last decades, the development of mining enterprises in Chile has been supported by exploitation activities above 4000 m, with work shifts of 4, 7 or more days in altitude, with resting periods of equivalent amount of time at sea level, compromising a large amount of workers (>60,000). Despite medical monitoring of the mining workers, the knowledge about the mechanisms involved in lung responses at short and long term is incomplete. Studying animal models allows us to perform tests of molecular biology and histology, after *in vivo* exposure to simulated hypobaric environment (hypobaric chamber). In this study, we used a rat model and hypothesized that: a) Short-term intermittent hypoxia (IH) does not produce OS, nor pulmonary vascular remodeling, but increase the antioxidant enzymatic (AE) expression and activity, and expression of HIF1 and 2; b) Long-term IH produces OS and pulmonary vascular remodeling, with increase expression and activity of AE, and expression of HIF1 and 2, when compared with their respective controls. In this thesis we use adult male Wistar rats, exposed to a simulated altitude of 4,600 m, equal to 428 torr, for 4 days and to 750 torr (~sea level) for 4 days, which define cycle of exposure. These rats were divided in 4 groups: 2 hypoxic groups exposed to 4 and 12 cycles defined as acute intermittent hypobaric hypoxia (AIHH) and chronic intermittent hypobaric hypoxia (CIHH) respectively, which were compared with 2 control groups, age-matched maintained in normoxia. AIHH showed an increase in catalase (CAT) activity, a decrease in glutathione peroxidase, an increase in OS and remodeling of distal arteries (increased thickness of the muscular layer and decreased lumen). In contrast, CIHH showed a decreased CAT activity, increased OS and vascular remodeling of medium to large arteries (thicker muscular layer and adventitia). In this study, we conclude that IHH induce vascular

remodeling and oxidative balance alterations, depending on the length of exposure. This study contributes with knowledge about the pulmonary effects of working shifts at hypobaria.

INTRODUCCIÓN

La altitud está asociada a disminución de la presión de oxígeno ambiental por una caída progresiva de la presión barométrica (PB) en función de la altitud geográfica. Vivir en condiciones de hipobaria de alta altitud implica un deterioro en la homeostasis cardiovascular y pulmonar de los individuos, producto de la generación de hipoxia a nivel respiratorio, lo que conlleva efectos perjudiciales para la estructura y función cardiopulmonar [1].

La hipoxia corresponde a una disminución del aporte de O₂ a nivel celular, incapaz de cubrir las demandas de los tejidos, alterando su metabolismo y los mecanismos de producción de energía. Hipoxia hipobárica es el descenso de aporte de oxígeno a los tejidos debido a una caída en la presión parcial de este gas por la exposición a una menor PB en altitud [2]. De acuerdo al tiempo de exposición o permanencia en alta altitud, la hipoxia se clasifica en [3]:

- 1) *Hipobaria Aguda*, cuando el sujeto se expone a altitud por un periodo corto de tiempo, horas o días, (turistas y montañistas);
- 2) *Hipobaria Crónica*, se refiere a un largo periodo de tiempo (años) en altitud de un individuo (nativos, residentes permanentes de tierras altas);
- 3) *Hipobaria Intermitente Crónica*, se refiere a una condición de desplazamiento a altitud, generalmente para trabajar (horas o días), con descenso por un período equivalente a nivel del mar (horas o días), manteniéndose la alternancia por un periodo prolongado (>6 meses).

Esta última forma de exposición es muy frecuente en trabajadores chilenos en astronomía, fuerzas armadas, funcionarios aduaneros, y mayoritariamente en faenas de la minería.

La condición de hipobaria intermitente crónica, se presenta en todo individuo que permanezca sobre los 3.000 msnm por más de 6 meses, con una estadía mínima de 30% de ese tiempo en sistemas de turnos rotativos a gran altitud y descanso a baja altitud. Las consecuencias de este tipo de exposición sobre la salud

cardiovascular han sido parcialmente descritas y aún son objetivo de estudio y de interés clínico. De hecho, la hipoxia hipobárica induce respuestas como vasoconstricción hipóxica pulmonar, lo que podría producir hipertensión arterial pulmonar (HAP) e hipertrofia ventricular derecha, si la permanencia en altitud es prolongada [4].

Para estudiar estos fenómenos y los mecanismos fisiopatológicos involucrados se han desarrollado modelos animales que simulan las condiciones ambientales a los cuales se ven expuestos los trabajadores de turnos en gran altitud. Por ejemplo, los modelos de ratas en estas condiciones desarrollan respuestas más leves que ratas expuestas a hipobaría continua, presentando una menor hipertrofia del ventrículo derecho (VD) y una menor remodelación de la arteria pulmonar [5]. Adicionalmente, algunos estudios describen un aumento en el estrés oxidativo y alteraciones de los mecanismos antioxidantes, especialmente a nivel de tejido cardiaco [6,7]. Algunos de ellos han demostrado efectos cardioprotectores de hipoxia hipobárica con tan solo 4 ciclos [8]. Sin embargo, escasos son los trabajos que describen las respuestas a altitud en exposiciones intermitentes, particularmente el tono oxidativo y cambios vasculares en tejido pulmonar.

Como consecuencia de la exposición a hipoxia hipobárica se activan mecanismos fisiopatológicos dirigidos a compensar la caída de la presión arterial de O_2 (PaO_2) [9-11]. Estos se asocian a un aumento del tono simpático gatillado por la descarga de los quimiorreceptores periféricos, a través de la liberación de catecolaminas, secreción de renina y aldosterona, reabsorción renal de sodio e incremento de la sensación de sed. Estos cambios generan un aumento de la volemia, de la resistencia vascular sistémica, lo que conlleva mayor pre y postcarga ventricular izquierda [12]. A nivel sistémico secundario al efecto simpaticomimético sobre la musculatura lisa vascular se produce vasodilatación arterial. Sin embargo, en el territorio pulmonar se induce vasoconstricción conocida como vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH), fenómeno que redistribuye el flujo de áreas pobremente ventiladas a zonas mejor ventiladas, aumentando la relación V/Q [9]. Junto con esta redistribución de la circulación pulmonar, se induce la hiperventilación alveolar, con

reducción de PaCO₂ y producción de alcalosis respiratoria. Estos efectos, tienden a asegurar una mayor PaO₂ y optimizan el transporte de O₂ a las células [13].

Como en la hipobaría crónica, la hipoxia alveolar se extiende a todo el pulmón, también esta VPH se observa en gran parte de la circulación pulmonar, llevando a una hipertensión pulmonar secundaria a hipoxia [14]. Dentro de los mecanismos que se activan en respuesta a hipoxia aguda, el *factor inducible por hipoxia 1* (HIF-1) se expresa ubicuamente, dado su papel fundamental en la respuesta adaptativa que incluyen: inducción de genes blancos que provocarán aclimatación bajo estas condiciones ambientales [15]. Además, hipoxia inhibe la expresión de los canales de potasio gatillados por voltaje (K_v 2,1 y K_v 1,5) lo que incrementa la concentración de K⁺ y de Ca⁺⁺ intracelular que despolariza las células musculares lisas vasculares (CMLV), generando vasoconstricción y remodelación vascular [16]. Por su parte, HIF-2 actúa en hipoxia más prolongada, induciendo genes que favorecen la proliferación e hipertrofia celular, lo que determinaría una reducción del diámetro de las arteriolas. Estos cambios estructurales llevan a la persistencia de la hipertensión pulmonar. HIF-2 se expresa principalmente en los tejidos con altos requerimientos de O₂, como corazón, pulmones y endotelio vascular, siendo responsable de la expresión de eritropoyetina (EPO), entre otros genes blanco [17].

El óxido nítrico (NO) es el principal mediador de la vasodilatación, sintetizado por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) en las células endoteliales, el cual difunde rápidamente al músculo liso vascular en donde activa a la guanilato ciclasa soluble (GCs), que genera guanilato monofosfato cíclico (GMPc). El GMPc induce respuesta celular a través de una disminución de la sensibilidad de los miofilamentos provocando relajación del tejido muscular o bien, antiproliferación celular [18]. En hipoxia, la biodisponibilidad del NO se reduce en el músculo liso vascular debido a varios mecanismos, entre ellos, desacoplamiento de la eNOS que induce mayor producción de anión superóxido (O₂⁻), desviando la generación de NO hacia la de peroxinitrito (ONOO⁻). Además, NO es un agente anti-proliferativo, por lo que un desbalance NO/O₂⁻, puede estar determinando el proceso de remodelación tanto en exposición permanente como intermitente [19]. Todo lo

anterior deriva en un aumento progresivo del tono vascular pulmonar y un mayor remodelamiento de la circulación pulmonar.

La hipoxia hipobárica produce incremento de las **especies reactivas de oxígeno (ERO)**, moléculas pequeñas altamente reactivas debido a presencia de electrones no apareados. Las ERO se forman de manera fisiológica como subproducto del metabolismo del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular [20]. Sin embargo, en hipoxia ambiental, de acuerdo a su concentración, las ERO pueden inducir o depletar algunos sistemas antioxidantes, como el sistema glutatión reducido (GSH) / oxidado (GSSG), lo que puede resultar en aumento de moléculas oxidantes y daños significativos a las estructuras celulares [6,21]. El desequilibrio entre la producción de ERO y la capacidad antioxidante endógena, donde esta última es superada por las especies oxidantes se denomina **Estrés oxidativo** [22]. Todos los seres vivos mantienen un tono oxido-reductor dentro de la célula, que es preservado por los sistemas enzimáticos y no enzimáticos que mantienen este balance. Desbalances en este estado normal rédox hacia un estado pro-oxidante, pueden causar efectos tóxicos a través de la producción de peróxidos y daño directo a los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y ADN [23]. La principal causa de **estrés oxidativo en hipobaría** es la baja capacidad del O_2 de ser reducido a H_2O por la enzima citocromo oxidasa en la cadena transportadora de electrones en la mitocondria. Esto produce una acumulación de electrones que con baja concentración de O_2 como aceptor final generará un gran número de ERO como O_2^- y radical hidroxilo (OH^\bullet), además de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) [19]. De igual forma, la hipoxia podría determinar una caída en la expresión y/o actividad de los mecanismos antioxidantes endógenos [24]. La respuesta contra esta injuria oxidativa está a cargo de un sistema de defensa enzimático [Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y Glutatión Peroxidasa (GPx)] y un mecanismo no enzimático comprendido por el sistema GSH / GSSG, ácido ascórbico (vitamina C), alfa tocoferol (vitamina E), carotenoides, y melatonina, entre otros [7]. Existe fuerte evidencia que el estrés oxidativo contribuye a la vasoconstricción pulmonar hipóxica crónica, mediante la liberación de Ca^{2+} citosólico en CML [26]. Una de las principales

fuentes de ERO estudiada en hipoxia es la enzima NADPH oxidasa (NOX), responsable de la inducción de la remodelación vascular e hipertensión pulmonar asociada a la hipoxia crónica [21]. Xantino-oxidoreductasa (XOR) es otra vía enzimática de generación de ERO, que en condiciones de hipoxia tiende a aumentar su actividad oxidasa, produciendo O_2^- . Además, el desacoplamiento de la eNOS en hipoxia aumenta la generación de O_2^- por esta enzima. Las ERO podrían inducir disfunción endotelial por incremento de los niveles de anión superóxido y peroxinitrito, y disminución de la biodisponibilidad de NO, cambios que además contribuyen a la remodelación vascular [20, 27].

Una consecuencia habitual de la hipoxia hipobárica crónica es el **remodelamiento vascular pulmonar** que se caracteriza por el engrosamiento de las capas de su pared, adventicia, muscular e íntima. Tal engrosamiento se produce por hipertrofia (crecimiento celular) y/o hiperplasia (proliferación) del tipo de células dominante en cada una de las capas: fibroblastos, células musculares lisas y endoteliales, respectivamente. Así también, ocurre por aumento de depósito de matriz extracelular que incluye: colágeno, elastina y fibronectina [28]. El engrosamiento de la capa media puede producirse en toda la circulación pulmonar, siendo de menor cuantía en las venas pulmonares. Por tanto, existe proliferación de nuevo músculo liso dentro de arterias parcialmente musculares y no musculares ubicadas en la periferia pulmonar (distales), fenómeno denominado muscularización vascular. La CML cambia de fenotipo no proliferativo a proliferativo por efecto de hipoxia pulmonar crónica, como crónica intermitente, atribuida a plasticidad celular. Este remodelamiento puede ser reversible si el tiempo de exposición es limitado y es sucedido por normoxia [29]. Por el contrario, sujetos que nacen y habitan permanente en alta altitud o se exponen crónicamente a altura geográfica, tienden a mantener una circulación pulmonar remodelada [1].

En base a la evidencia existente, se desconoce con precisión el papel del estrés oxidativo en los mecanismos de respuesta a la hipoxia hipobárica intermitente a nivel pulmonar, tanto aguda como crónica. El objetivo de esta tesis es determinar y correlacionar algunos marcadores de estrés oxidativo, expresión de enzimas

antioxidantes y factores inducibles por hipoxia, así como la estructura vascular en el tejido pulmonar, en ratas expuestas a hipoxia hipobárica intermitente, evaluando los efectos de pocos ciclos (exposición aguda, 4 ciclos) y varios ciclos (exposición crónica, 12 ciclos).

Por lo tanto, en esta tesis determinaremos los efectos de la hipoxia intermitente en 4 ciclos (aguda) y en 12 ciclos (crónica) de duración sobre los marcadores de estrés oxidativo, defensa antioxidante y estructura vascular pulmonar.

HIPÓTESIS

En este trabajo se proponen 2 hipótesis interrelacionadas entre sí:

1.- La hipoxia hipobárica intermitente aguda (4 ciclos) inducirá elevación de la expresión y actividad enzimática AO en el tejido pulmonar, sin cambios en el nivel de estrés oxidativo ni remodelación de las arterias pulmonares.

2.- La hipoxia hipobárica intermitente crónica (12 ciclos) incrementará la expresión y actividad enzimática AO en el tejido pulmonar e inducirá estrés oxidativo y remodelación vascular pulmonar.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad antioxidante, el nivel de estrés oxidativo y la estructura vascular pulmonar en ratas expuestas a hipoxia hipobárica intermitente aguda (4 ciclos, HHIA) y crónica (12 ciclos, HHIC) y compararlos con sus respectivos controles.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar la respuesta pulmonar en grupos de ratas expuestas a hipoxia hipobárica intermitente aguda (4 ciclos, HHIA) y crónica (12 ciclos, HI) y compararlos con sus respectivos controles, a través de las siguientes variables:

1. Expresión de las enzimas antioxidantes manganeso-superóxido dismutasa (Mn-SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) en tejido pulmonar.
2. Actividad de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) en tejido pulmonar.
3. Expresión de los factores inducibles por hipoxia 1 y 2 (HIF-1 y HIF-2) en tejido pulmonar.
4. Nivel de estrés oxidativo mediante índice tiólico (GSH/GSSG) y lipoperoxidación (TBARS) en tejido pulmonar.
5. Grado de remodelamiento vascular pulmonar mediante histomorfometría.

MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los experimentos realizados en este trabajo se llevaron a cabo en el Laboratorio de Función y Reactividad Vascular, Programa de Fisiopatología, ICBM, Facultad de Medicina (campus Oriente), de la Universidad de Chile. Todos los manejos, cuidados y procedimientos con los animales utilizados en esta Tesis fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Protocolo CBA #865).

Se utilizaron 24 ratas machos, cepa Wistar, de 10 semanas de edad y 250 g aproximadamente. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas de humedad y temperatura (22-25°C; humedad relativa entre 45-55%, respectivamente), ciclo luz/oscuridad de 12/12h y libre acceso a alimentación y agua de bebida.

Los animales fueron divididos en 4 grupos experimentales de 6 ratas cada uno. Dos grupos fueron expuestos a hipoxia hipobárica intermitente en una bicámara hipobárica. Un grupo se denominó HIA (hipóxicos intermitentes agudos), que fue expuesto durante 4 ciclos y el grupo HIC (hipóxicos intermitentes crónicos) por 12 ciclos. Cada ciclo constó de 4 días dentro de la cámara hipobárica, a 428 Torr equivalente a 4600 msnm, y cuatro días fuera de ella en normobaría, ~750 Torr (Figura 1). Además, se desarrollaron dos grupos controles normóxicos normobáricos, el primero denominado NA que se mantuvo en equivalente a 4 ciclos (32 días) en esta condición y otro denominado NC que lo hizo por 12 ciclos (96 días) [6, 32].

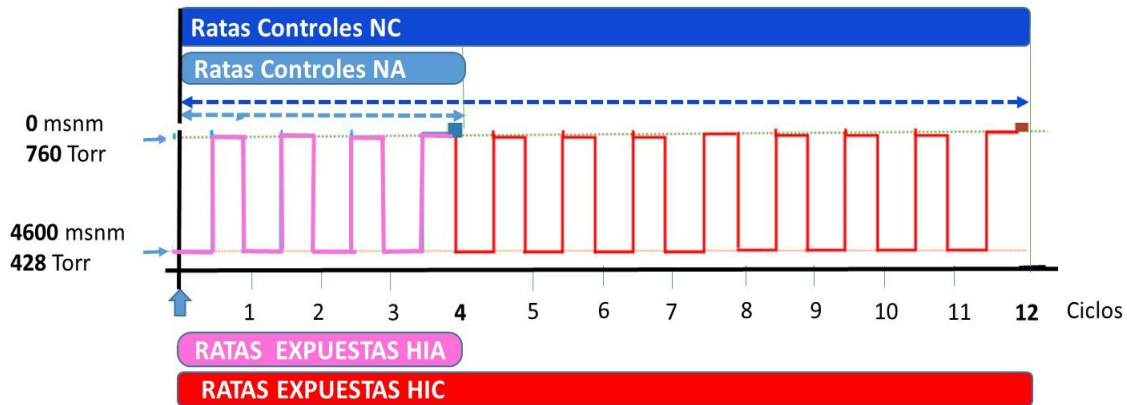


Figura 1. Modelo experimental utilizado en hipoxia hipobárica intermitente (HHI). El esquema representa 2 estudios realizados en paralelo: exposición HHI aguda (4 ciclos) y crónica (12 ciclos). Se utilizaron cuatro grupos de ratas, 2 controles en normobaria: **NA** (barra celeste) por 4 ciclos y **NC**, (barra azul) por 12 ciclos; y 2 grupos expuestos a hipobaria: **HIA** (barra rosada) por 4 ciclos y **HIC** (barra roja) por 12 ciclos. Cada ciclo de HHI consta de 4 d en cámara hipobárica, 428 Torr y 4 d fuera de ella, normobaria, ~750 Torr.

Obtención de Muestras

Una vez finalizado el período experimental, las ratas fueron anestesiadas profundamente, a través de una inyección intraperitoneal de Tiopental sódico 100 mg/Kg IP (OPET, Laboratorio Chile). Una vez constatada arreflexia, se realizó una toracotomía para extraer corazón y pulmón, y asegurar la eutanasia por exsanguinación en anestesia profunda. Los pulmones fueron inmediatamente pesados en una balanza electrónica (WTB 200, Radwag). El pulmón izquierdo fue dividido en 2 partes, el tercio inferior fue rápidamente congelado y mantenido a -80°C , para ensayos de biología molecular. Los 2/3 superiores fueron fijados en formaldehído al 4% por 24 h (inmersión), tras lo cual se sustituyó el medio preservante por PBS, manteniendo en ese medio hasta la realización de la técnica histológica (Figura 2).

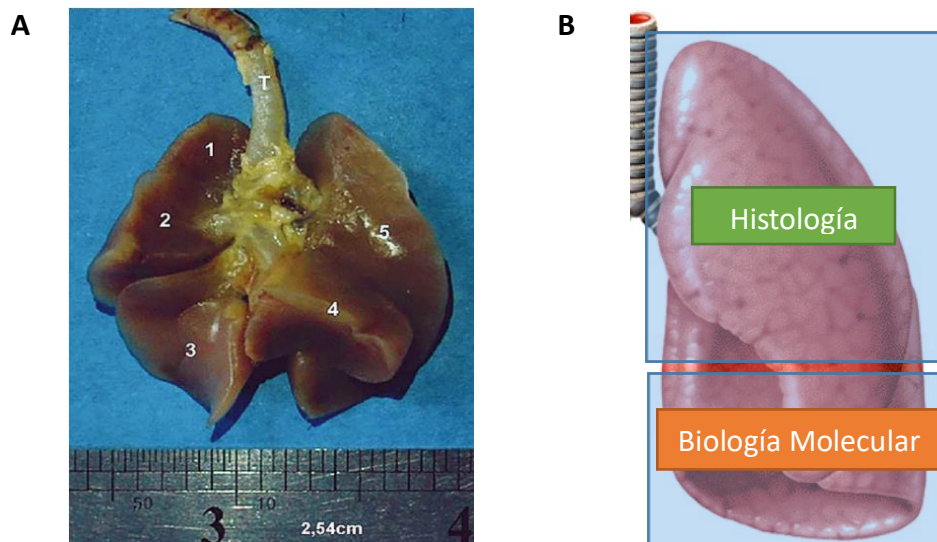


Figura 2. Utilización y destino del pulmón izquierdo. **A.** Fotografía de los pulmones húmedos. 1: Lóbulo Craneal Pulmón Derecho (PD), 2: Lóbulo Medio PD, 3: Lóbulo Caudal PD, 4: Lóbulo Accesorio PD, 5: Pulmón Izquierdo, y T: Tráquea (Obtenido de Olivares & Gil, 2016) [30]. **B.** Esquema de la división efectuada del pulmón izquierdo para el estudio histomorfológico (2/3 superiores) y para biología molecular (1/3 inferior).

Biología Molecular

Expresión de proteínas a nivel pulmonar

Mediante Western Blot se determinó el nivel proteico de las enzimas antioxidantes Manganese-superóxido dismutasa (Mn-SOD), Catalasa (CAT) y Glutación Peroxidasa (GPx) y de los factores inducidos por hipoxia 1 (HIF-1) y 2 (HIF-2) en tejido pulmonar. La proteína β -actina se utilizó como proteína control para normalizar los resultados [31].

Para homogenizar el tejido pulmonar, se obtuvieron 150-300 μ g de tejido pulmonar congelado, el cual fue lisado a través de un medio mecánico (trituration con cuchilla giratoria) previo al lisado químico en buffer de lisis (63,5 mM Tris / HCl ph 6,8; 10% glicerol, 2% SDS, 1 mM ortovanadato de sodio, 50 μ g / mL leupeptina y 5% 2-

mercaptoetanol) y centrifugado a 5000 xg a 4°C para obtener el sobrenadante como muestra para realizar Western Blot, previa determinación de concentración proteica en cada homogenizado [31].

Determinación proteica con método Bradford

Para la estandarización de las muestras de los distintos experimentos realizados se midieron las proteínas de interés según método de Bradford [32]. Se realizó una mezcla en tubos Khan que contienen 10 µL de dilución de muestra, 790 µL de agua destilada y 200 µL de reactivo de Bradford (Bio-Rad California, USA) para ser incubado por 20 minutos y luego cuantificado en espectrómetro a 595 nm. Se estandarizaron las mediciones de absorbancia en base a una curva estándar realizada con diluciones de albúmina sérica bovina (BSA) en un rango de 0,3 - 1,5 µg [33].

Western Blot

Los lisados de proteínas (0,5 – 30 µg según proteína) fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (4% de gel concentrado y 10% de gel de corrida) con una cámara (Bio Rad Mini-Vertical PAGE / Blotting System California, USA), realizándose a un amperaje constante de 50 MA durante 2 horas aproximadamente. Luego se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amsterdam, Germany) a un voltaje constante de 50 V por hora.

Las membranas fueron bloqueadas con leche semidescremada al 4% p/v en PBS 1X durante 1 h y posteriormente fueron incubadas durante 1 h con anticuerpos primarios comerciales (Tabla 1) para cada una de las proteínas estudiadas. Luego, las membranas fueron lavadas 3 veces por 10 minutos cada vez en PBS 1X. Las membranas se incuban en Tween 20 0,1%, leche al 0,4% y el anticuerpo secundario conjugado con HRP (Anti-Mouse, Millipore, MAB3572). A continuación se realizaron

3 lavados por 10 min cada uno y luego se incubó por 5 min en una solución de 4 mL de Super Signal West Pico (2 mL de Super Signal West Pico Stable Peroxide + 2 mL Super Signal West Pico Lumino/Enhancer). Por último, la membrana fue montada en una cámara reveladora 3600 (Li-Cor, C Digit) y se cuantificó la expresión proteica por densitometría clásica, utilizando el software Image Studio V 3.1. Las densidades de las señales fueron expresadas como razón de β -actina para normalizar la carga.

Tabla 1. Anticuerpos y condiciones experimentales utilizadas para WB.

| Anticuerpo | Peso Molecular, μ g | Fabricante | N° Catálogo | Concentración Anticuerpo 1° | Concentración Anticuerpo 2° |
|---------------------|-------------------------|------------|-------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Anti-Mn-SOD | 22 | Cayman | 10011389 | 1:1000 | 1:5000 |
| Anti-CAT | 60 | Abcam | Ab16731 | 1:10000 | 1:5000 |
| Anti-GPx | 24 | Abcam | Ab59546 | 1:1000 | 1:5000 |
| Anti-HIF-1 α | 116 | Abcam | Ab2185 | 1:1000 | 1:5000 |
| Anti-HIF-2 | 116 | Abcam | Ab109616 | 1:1000 | 1:5000 |

Actividad de enzimas antioxidantes pulmonares

Los ensayos para determinar la actividad de enzimas AO en tejido pulmonar se efectuaron con kit comerciales.

Superóxido Dismutasa (SOD). El kit de ensayo de SOD Cayman Chemical (Item n° 706002, MI, USA) [34] mide la dismutación de radicales superóxido generados por xantino oxidasa e hipoxantina. La curva estándar generada usando esta enzima provee una media de cuantificación exacta de la actividad de los 3 tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y FeSOD). Este kit de ensayo utiliza una sal de tetrazolium para detectar el radical superóxido generado por xantino oxidasa e hipoxantina (Figura 3). Una unidad de SOD es definida como la cantidad de enzima necesaria para observar el 50% de dismutación de O_2^- [32].

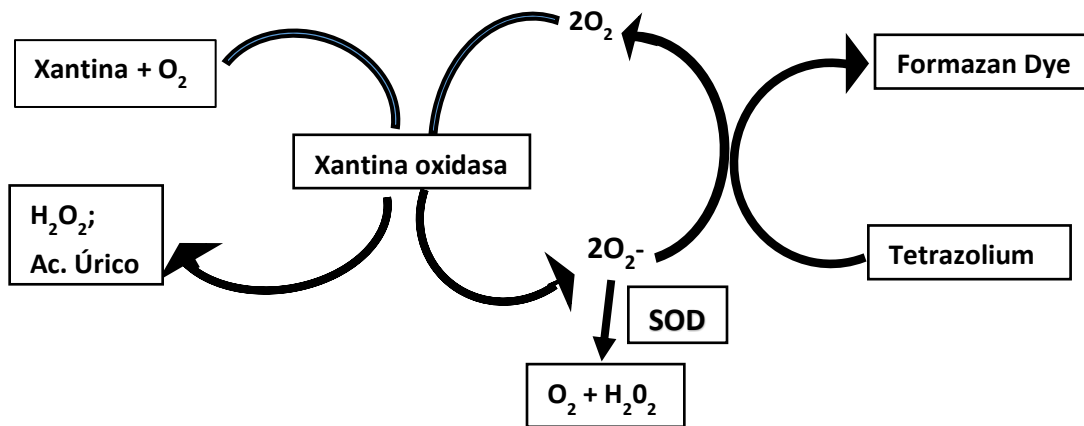


Figura 3. Esquema de ensayo de **Superóxido Dismutasa**.

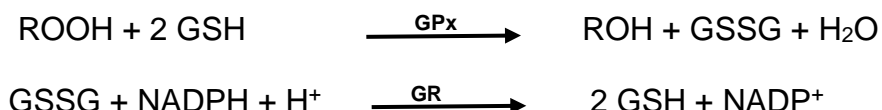
Catalasa (CAT). Esta enzima cataliza la conversión de 2 moléculas de H₂O₂ a O₂ molecular y 2 moléculas de H₂O (actividad catalítica). El kit de ensayo de catalasa Cayman Chemical (Item n° 707002, MI, USA) [35] utiliza la función peroxidativa de CAT para la determinación de la actividad enzimática. El método está basado en la reacción de CAT con metanol en presencia de una óptima concentración de H₂O₂. El formaldehído producido es medido espectrofotométricamente con 4-amino-3-Hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald) como cromógeno. Purpald junto con aldehídos en condiciones de oxidación, cambian desde incoloro a púrpura a 540 nm. Los resultados se expresaron en nmol/min/mg de formación de formaldehído [32].



Glutación peroxidasa (GPx). Para determinar la actividad de la GPx se utilizó el kit de ensayo Cayman Chemical (Item n° 703102 Michigan, USA) [36] que mide la actividad indirectamente por una reacción acoplada con glutación reductasa (GR). El glutación oxidado (GSSG) es producido secundario a la reducción de un

hidroperóxido por GPx siendo reciclado a estado reducido por GR y NADPH. La oxidación de NADPH a NADP⁺ está acompañada por una baja de la absorbancia a 340 nm. El grado de disminución en la A₃₄₀ es directamente proporcional a la actividad de GPx en la muestra.

La actividad de GPx se expresó en nmol/min/mg



Marcadores de estrés oxidativo

Determinación del Glutati6n reducido y Glutati6n oxidado.

A 150 µg de tejido pulmonar se le a11adi6 un volumen de 5 veces el peso del tejido de 1cido sulfosalicilico 5% (ASS) y 0,25 mM de EDTA. Posteriormente, el tejido se homogeniz6 (OMNI-MIXER) y centrifug6 a 3000 xg por 5' a 4°C, y el sobrenadante fue utilizado en la valoraci6n de glutati6n GSSG.

Preparaci6n del tejido. 250 mg fueron homogenizados junto a 3,75 mL buffer fosfato EDTA y 1 mL de 25% HPO₃, que fue usado como un precipitante de prote6nas. El homogenizado fue centrifugado a 4°C a 100.000 xg / 30' obteniendo el sobrenadante para el ensayo de GSSG y GSH.

Ensayo GSH [37]: A partir de 0,5 mL de sobrenadante, 4,5 mL de fosfato buffer EDTA, pH 8,0. La mezcla final contiene 100 µL de tejido sobrenadante diluido, 1,8 mL de fosfato buffer EDTA y 100µL de soluci6n OPT (o-Phthalaldehyde). Despu6s de una cuidadosa combinaci6n e incubaci6n a t° ambiente por 15', la soluci6n fue transferida a una cubeta para determinar la fluorescencia a 420 nm con una activaci6n a 350nm (Figura 4).

Ensayo GSSG. 0,5 mL de sobrenadante fue incubado a temperatura ambiente con 200 µL de 0,04 M NEM (N-ethylmaleimide) por 30 min en interacci6n con GSH

presente en los tejidos. A la mezcla se agregaron 4,3 mL de 0,1 N NaOH. Una porción de 100µL de la mezcla fue tomada para medir GSSG, usando el procedimiento semejante al ensayo para GSH, excepto que 0,1 N NaOH fue empleado como diluyente en vez de fosfato buffer EDTA. La determinación de GSSG se efectúa de igual forma a GSH (Figura 4).

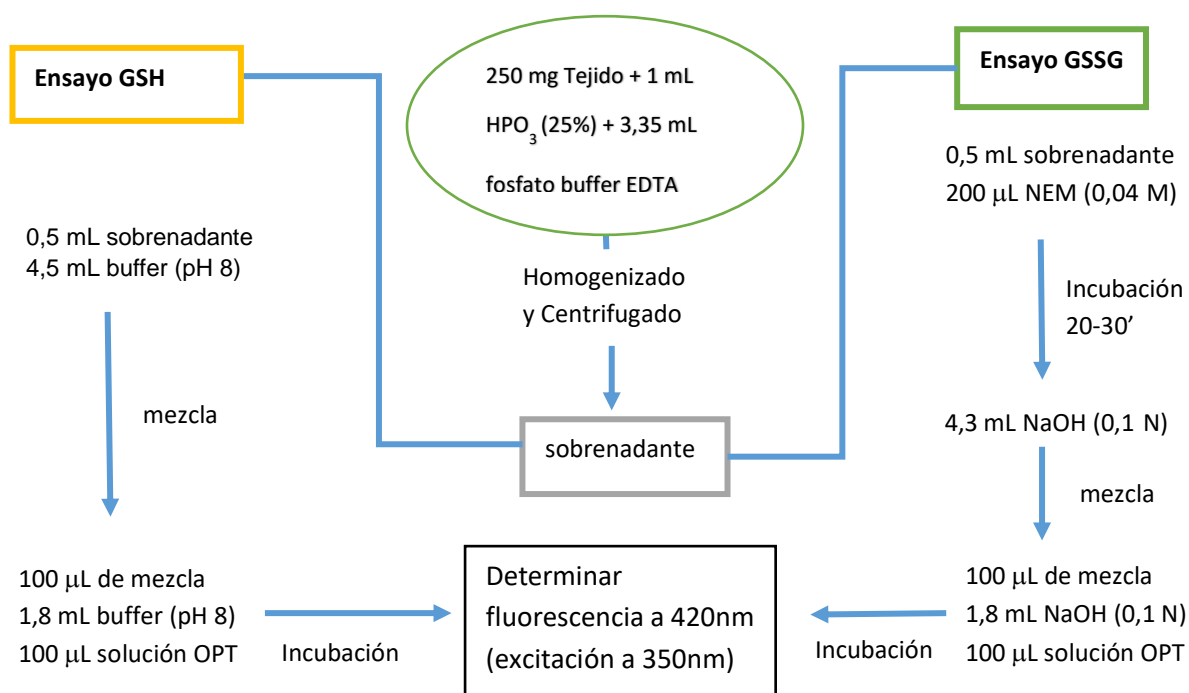


Figura 4. Procedimiento para determinar relación GSSG /GSH (estado redox) en tejidos (Basado en Hissin P, Hilf. *Analytical Biochemistry*. 1976; 74: 214-226) [37].

Determinación reacción de Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) en tejido pulmonar.

Se homogenizó 1 g de tejido pulmonar húmedo y 9 mL de KCl (1,15%) con homogenizador de cuchillas rotatorias. Para realizar la reacción de TBARS, se mezclaron 0,1 mL de muestra, 0,2 mL de SDS de 8,1% (dodecyl sulfate), 1,5 mL al 20% de ácido acético fue ajustada con NaOH a pH 3,5 y 1,5 mL de solución TBA al

0,8%. Esta solución fue calentada a 95°C por 60 min usando bolitas de cristales como condensador. Después de enfriarse se agregó 1 ml de agua destilada y 5,0 ml de la mezcla n-butanol y piridina (15:1) y se agitó vigorosamente. Después se centrifugó a 4000 rpm por 10 min, y la absorbancia de la capa orgánica (capa superior) fue medida a 532 nm. Los niveles de peróxidos lipídicos fueron expresados como nmol de MDA [38].

Histomorfometría

Las muestras fijadas fueron deshidratadas en una batería de alcoholes ascendentes desde alcohol de 50° hasta llegar a alcohol absoluto. Posteriormente, el alcohol es reemplazado con HistoClear mediante inmersión previo a la impregnación en parafina a 60°C. Luego las muestras impregnadas fueron incluidas en bloques de parafina y se realizaron cortes de 4-5 µm de espesor con un micrótopo de rotación (Leitz, Alemania). A continuación, los cortes histológicos obtenidos fueron desparafinados con HistoClear y rehidratados pasando por una batería de alcoholes desde 100° hasta alcohol de 70° para terminar la hidratación por un paso por agua corriente y finalmente por agua destilada. Finalmente, los cortes histológicos fueron teñidos según el protocolo de tinción de Van Gieson elásticas [39].

Se tomaron microfotografías de los cortes teñidos en un microscopio Olympus BX41 acoplado a una cámara digital marca Jenopkik modelo PregRes ® C3 (Jena, Alemania). El análisis de las microfotografías obtenidas se realizó con el software de análisis de imágenes ImageJ Pro-Plus.

Se estudiaron las características histomorfológicas de arterias pulmonares pequeñas (< 250 µm), medianas (250-600 µm) y grandes (600-1500 µm) en los 4 grupos experimentales. A la vez, las arterias se estudiaron en 3 ubicaciones pulmonares: craneales, laterales y mediales. Según estas características, se eligieron al menos 3 arterias por animal por sector pulmonar. Los sectores pulmonares fueron determinados como craneal, medial ventral y medial dorsal. Esta división fue efectuada para evaluar los sectores que definen diferencias en la

relación ventilación/perfusión (V/Q), donde teóricamente el sector dorsal tiene una relación preferente a la V mientras que el ventral una relación preferente a la Q [40]. Se analizaron las propiedades morfológicas (grosor de adventicia y muscular; diámetro interno y externo), y se evaluaron las razones entre estos componentes: Adventicia / Lumen, Grosor Muscular / Lumen, Pared / Lumen y Pared /Total. Luego se hizo un promedio de cada animal, según ubicación y tamaño de los vasos [41].

Análisis Estadístico

Los datos fueron expresados como promedio \pm error estándar de la media (EEM). Así como, medianas, rangos intercuartílicos y límites inferior y superior, a través de diagrama de cajas, cuando correspondió.

Debido al “n” reducido, se realizó chequeo de la distribución según test de Kolmogorov-Smirnov Kolmogorov, por lo cual las variables no distribuían normal. Se utilizó expresión de variables con test de Mann–Whitney, con p significativo menor a 0,05, usando el software Graph Pad Prism 6,01.

RESULTADOS

EXPOSICIÓN A HIPOXIA HIPOBÁRICA INTERMITENTE AGUDA (HIA)

Peso Corporal

En las ratas HIA y en sus controles NA se determinaron los pesos corporales después de cada uno de los 4 ciclos de exposición. Hubo un menor peso corporal después del primer ciclo en HIA ($p= 0,0087$) vs NA, el cual se recupera a partir del segundo ciclo, en relación a sus controles normóxicas (Fig. 5).

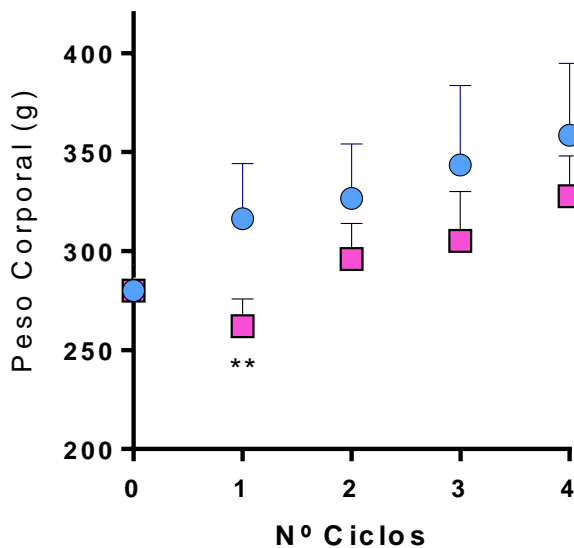


Figura 5. Peso corporal en ratas HIA y controles NA.

Peso corporal (g) durante el período experimental (Promedio \pm EEM). Los grupos son ratas normóxicas agudas (NA, círculo celeste, $n=6$) y ratas expuestas a 4 ciclos de normobaria/hipobaria (HIA, cuadrado rosado, $n=6$). Diferencias significativas ($p < 0,01$): ** vs NA.

Peso corporal y pulmonar post mortem

De igual forma, los pesos corporales *postmortem* y los pesos húmedos de los pulmones no presentaron diferencias entre NA y HIA, así como en la relación porcentual entre peso pulmonar (PP) y peso corporal (PC), como se detalla en la Tabla 2.

| Exposición a 4 ciclos HHI | NA | HIA |
|---------------------------|-------------|-------------|
| Pesos Corporales (PC), g | 362 ± 17 | 346 ± 7 |
| Pesos Pulmonares (PP), g | 2,53 ± 0,30 | 2,55 ± 0,20 |
| Razón % PP / PC | 0,70 ± 0,10 | 0,74 ± 0,30 |

Tabla 2. Pesos determinados al final del 4° ciclo. Los datos son expresados en promedio ± EEM. Los grupos son ratas normóxicas agudas (NA, celeste, n=6) y ratas expuestas a 4 ciclos de normobaría/hipobaría (HIA, rosada, n=6).

Expresión de enzimas antioxidantes

Se estudiaron los niveles proteicos en homogenizado de pulmón de ratas HIA y sus respectivos controles (Técnica de Western Blot) expresados en diagramas de cajas, de MnSOD (Fig. 6 A), CAT (Fig. 6 B) y GPx (Fig. 6 C). En ellas se pueden observar que no hubo diferencias significativas entre HIA y NA.

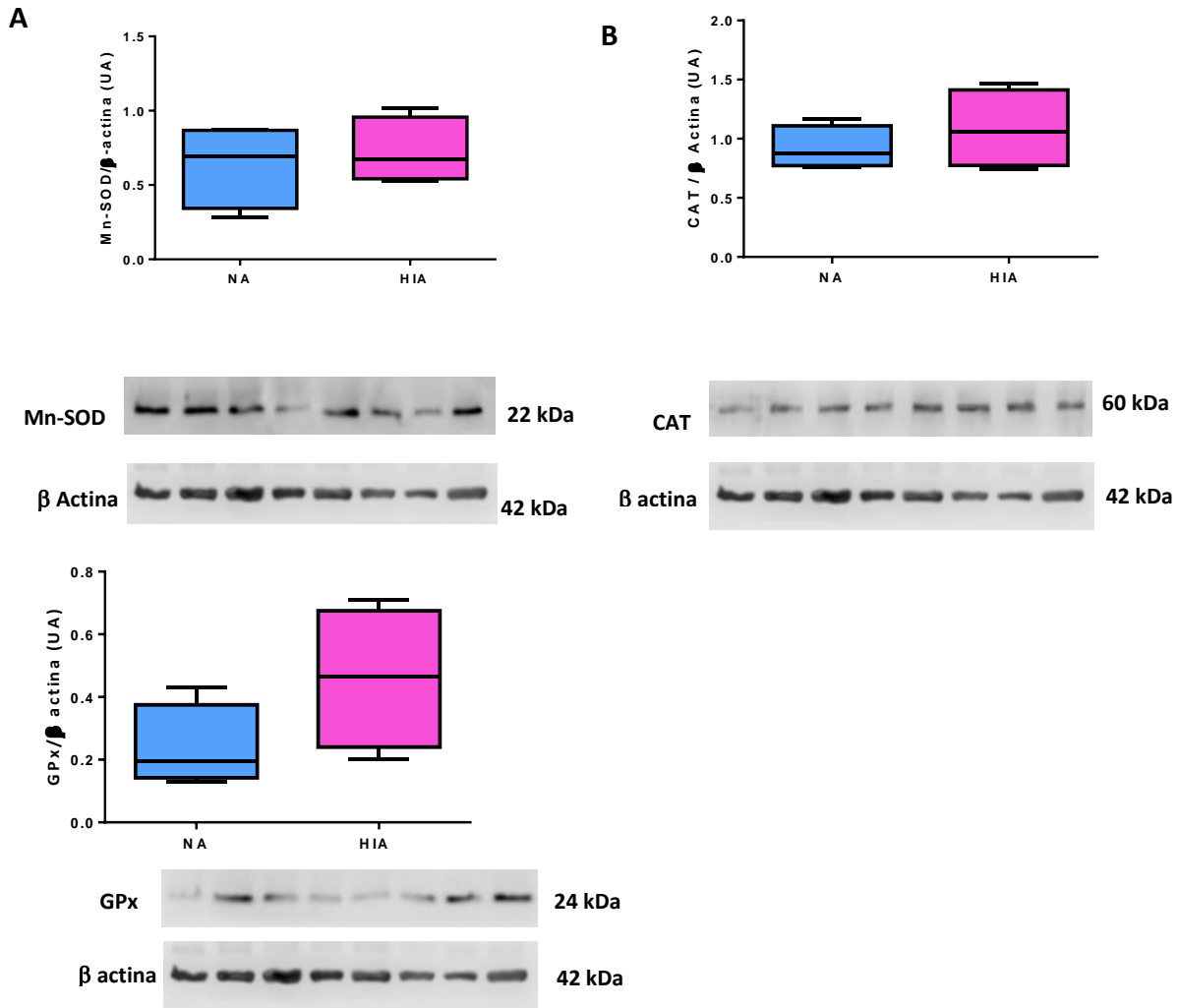


Figura 6. Expresión de enzimas antioxidantes en pulmón. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuartílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes de los resultados de expresión proteica de manganeso superóxido dismutasa (A, Mn-SOD), catalasa (B, CAT) y glutatión peroxidasa (C, GPx) en unidades arbitrarias (UA). Los grupos son ratas normóxicas agudas (NA, celeste, n=4) y ratas expuestas a 4 ciclos de normobaría/hipobaría (HIA, rosada, n=4).

Expresión del Factor Inducible por Hipoxia

Tanto la expresión de HIF-1 (Fig. 7A) como HIF-2 (Fig. 7B) en homogenizado de tejido pulmonar fueron similares en ratas HIA en relación a sus controles normobáricos.

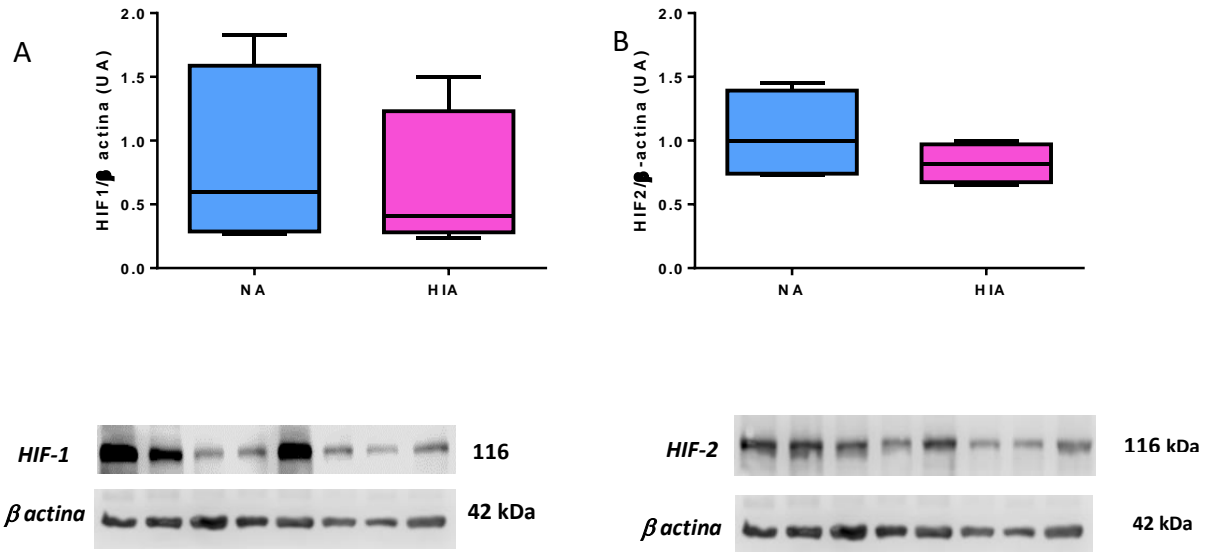


Figura 7. Expresión de Factor inducible por hipoxia (HIF) en pulmón. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes de la expresión proteica de HIF-1 (A) y HIF 2 (B) en ratas HIA y controles NA en unidades arbitrarias (UA). Los grupos son ratas normóxicas agudas (NA, celeste,

Actividad de Enzimas Antioxidantes

La actividad de SOD no presentó diferencias entre grupos. Sin embargo, la actividad de CAT fue mayor en HIA ($p = 0,0159$) * vs NA. En contraste, la actividad de GPx fue significativamente menor en el grupo HIA ($p = 0,0286$) * vs NA (Figs. 8 A-C).

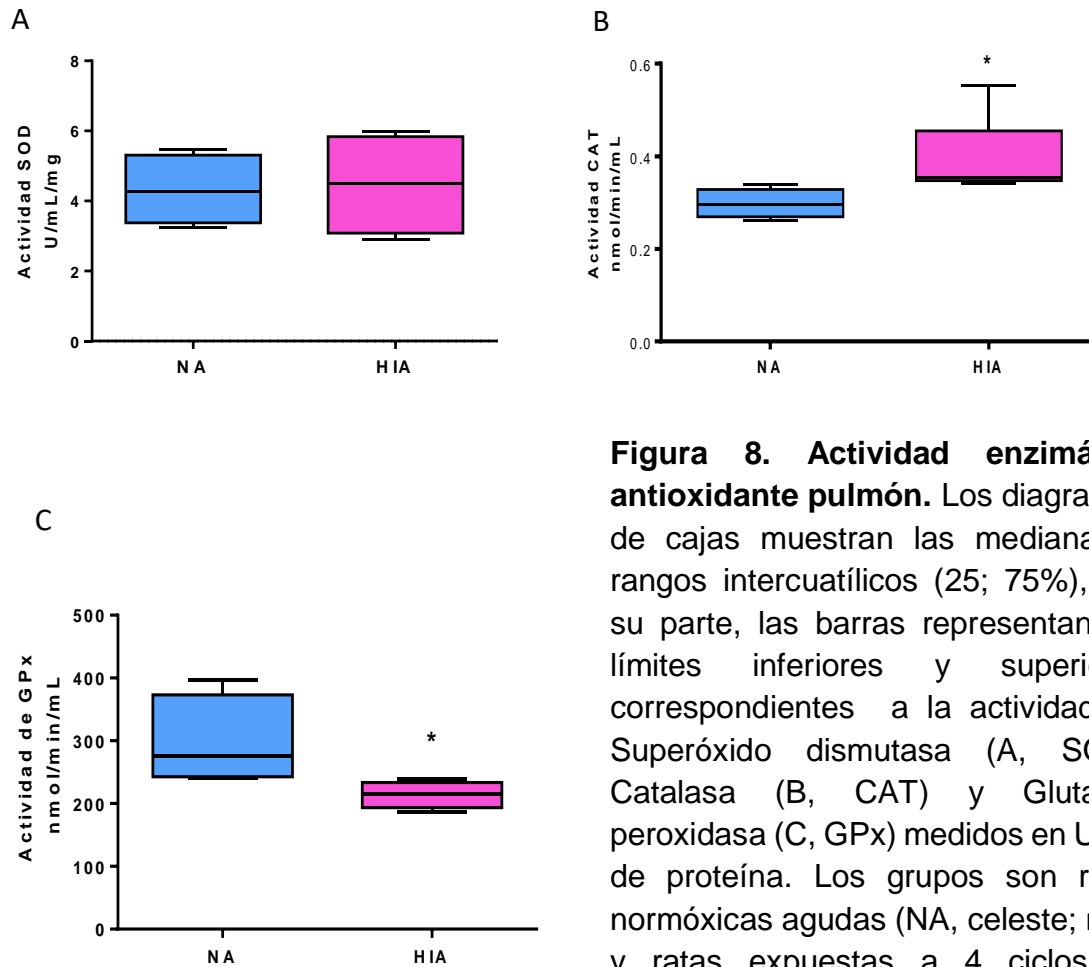


Figura 8. Actividad enzimática antioxidante pulmón.

Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes a la actividad de Superóxido dismutasa (A, SOD), Catalasa (B, CAT) y Glutación peroxidasa (C, GPx) medidos en U/mg de proteína. Los grupos son ratas normóxicas agudas (NA, celeste; $n=4$) y ratas expuestas a 4 ciclos de normobaría/hipobaría (HIA, rosada; $n=4$). Diferencias significativas ($p < 0,05$): * vs NA.

Marcadores de Estrés Oxidativo

Se estudió la relación GSSG / GSH en tejido pulmonar de ratas expuestas a HIA vs sus controles normobáricos agudos, encontrándose mayores niveles en el grupo HIA ($p= 0,0079$) ** vs NA (Fig. 9A). Además, la reacción del tejido pulmonar con ácido tiobarbitúrico (TBARS) fue mayor en ratas hipóxicas HIA ($p= 0,0079$) ** vs NA (Fig. 9B)

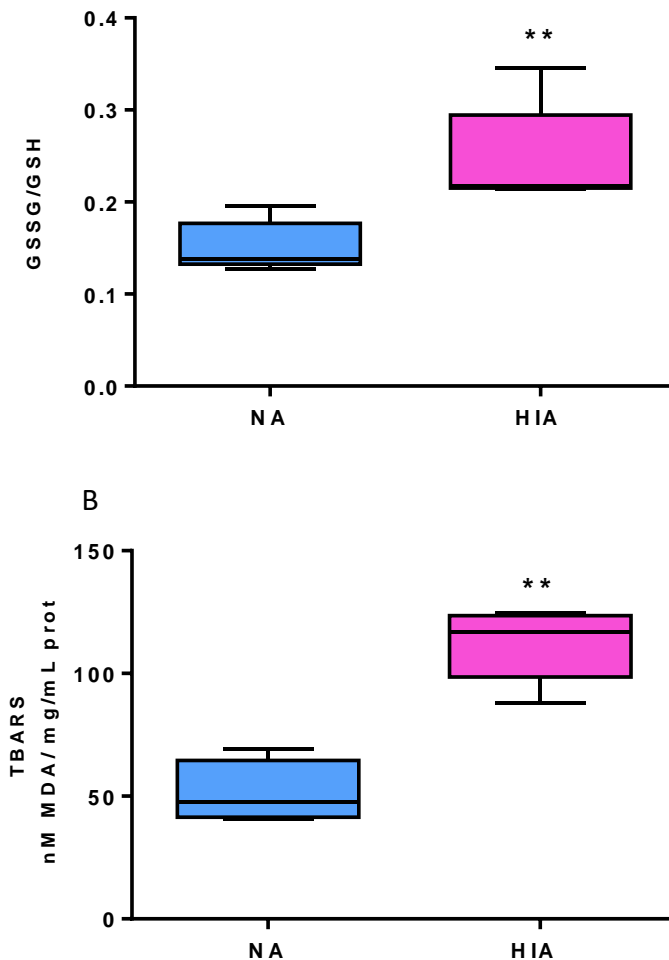
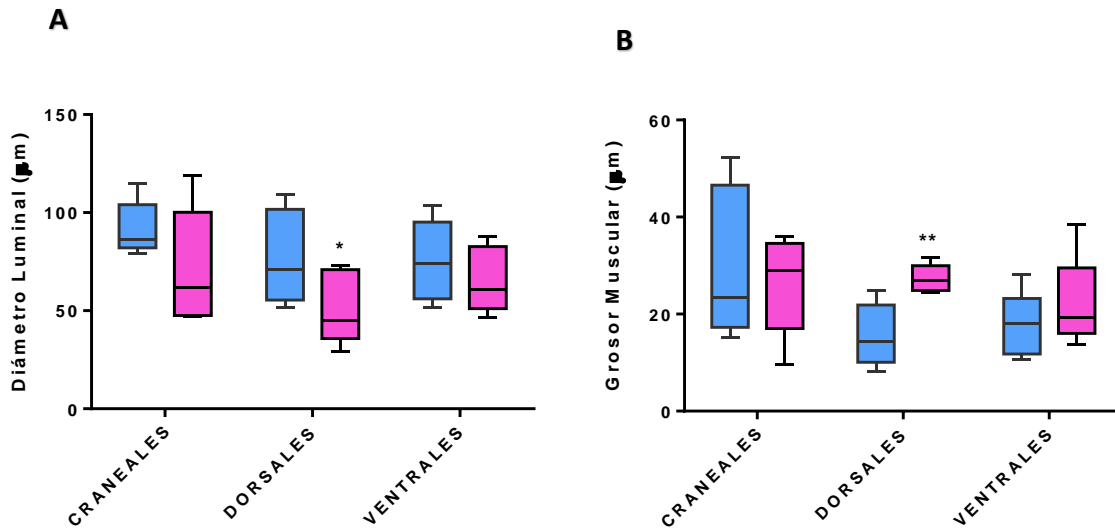


Figura 9. Marcadores de estrés oxidativo en pulmón. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes a razón Glutatión disulfuro (GSSG) vs Glutatión reducido (GSH) (A) y TBARS (B) medido en nM MDA/mg proteína de homogenizado de tejido pulmonar de ratas normóxicas (NA, celeste, n=4) y ratas expuestas a 4 ciclos de normobaria/hipobaría (HIA, rosada, n=4).. Diferencias significativas ($p < 0, 01$): ** vs NA.

Parámetros Histomorfológicos

Diámetros y grosores de arterias pequeñas

Se estudiaron los diámetros lumbales y vasculares, así como los grosores de capas media, adventicia y pared de AP pequeñas (< 250 μm). El grupo HIA presentó una reducción del diámetro interno (luminal) y aumento de grosor de la capa muscular a nivel de dorsales. En contraste, las AP pequeñas de ubicación craneales y ventrales no presentaron diferencias entre grupos experimentales, a excepción del menor diámetro vascular total en craneales (Fig. 10 A-D).



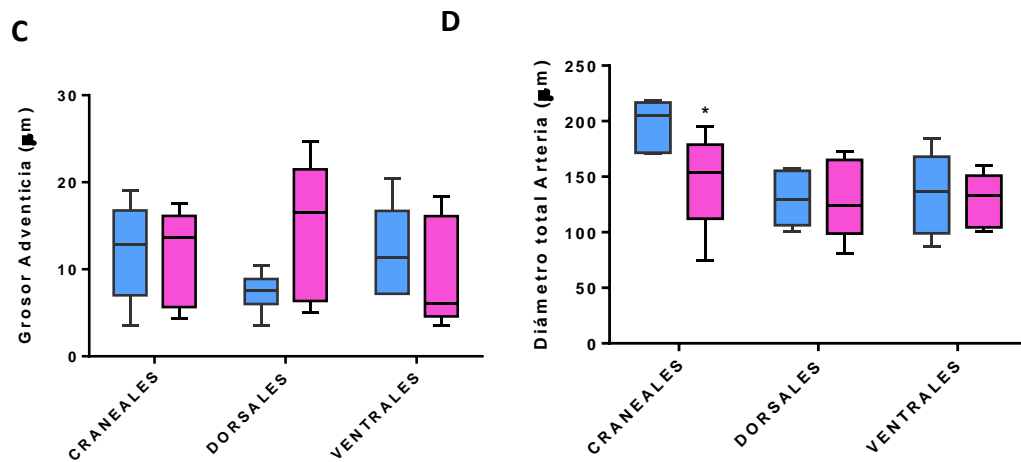


Figura 10. Características morfométricas de arterias pequeñas (< 250 μm) en diversas regiones pulmonares. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes a diámetro luminal (A); espesor de la pared muscular (B); espesor de la túnica adventicia (C); y el diámetro vascular total (D) en μm. Los grupos son ratas normobáricas agudas (NA, celestes; n=6) y ratas expuestas a 4 ciclos de Normobaria/Hipobaría (HIA, rosadas; n=6). Diferencias significativas ($p < 0,05$): * vs NA.

Razones entre componentes de Arterias Pequeñas

Para determinar la relación de los cambios y su proporcionalidad, se calcularon las razones entre los componentes de las arterias. En las arterias dorsales, se observó aumento significativo en las razones espesor muscular/lumen, espesor pared/lumen, espesor adventicia/lumen y área pared/total. Además, las arterias ventrales del grupo HIA también presentaron aumento en sus razones espesor Muscular/Lumen y área Pared/Total. Por otra parte, las arterias craneales de ambos grupos presentaron razones similares (Figs. 11 A-D).

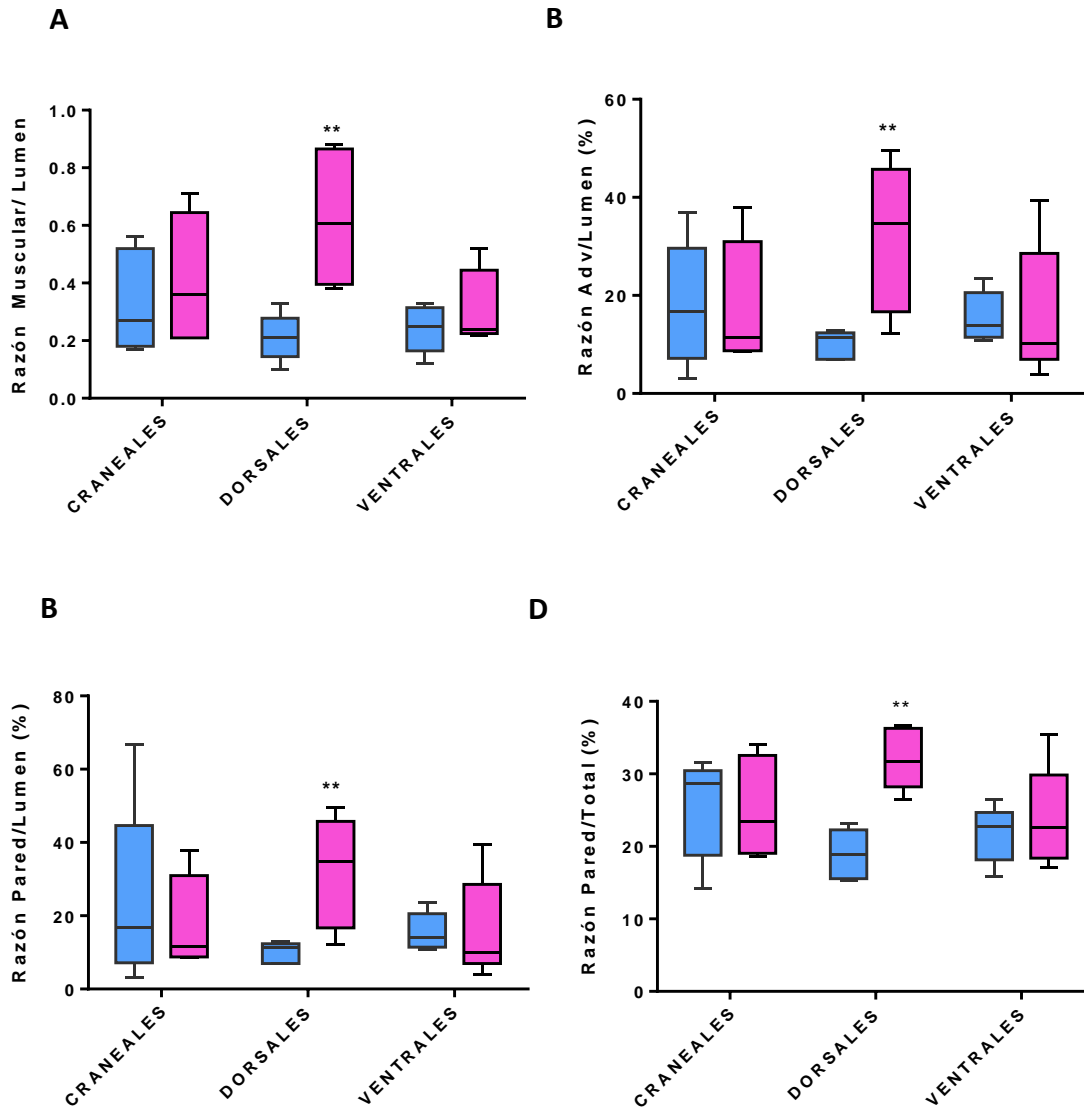


Figura 11. Razones de componentes de arterias pequeñas (<250 μ m) en diversas regiones pulmonares. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes a razón espesor músculo vs diámetro lumen (A); razón espesor adventicia vs diámetro lumen (B); razón espesor pared vs diámetro lumen (C); y razón espesor pared vs diámetro total (D). Los grupos son ratas normobáricas agudas (NA, celestes; n=6) y ratas expuestas a 4 ciclos de Normobaria/Hipobaria (HIA, rosadas; n=6). Diferencias significativas ($p < 0,05$): * vs NA; ($p < 0,01$): ** vs NA.

Representación Gráfica de AP pequeñas y remodelamiento subsecuente en HIA

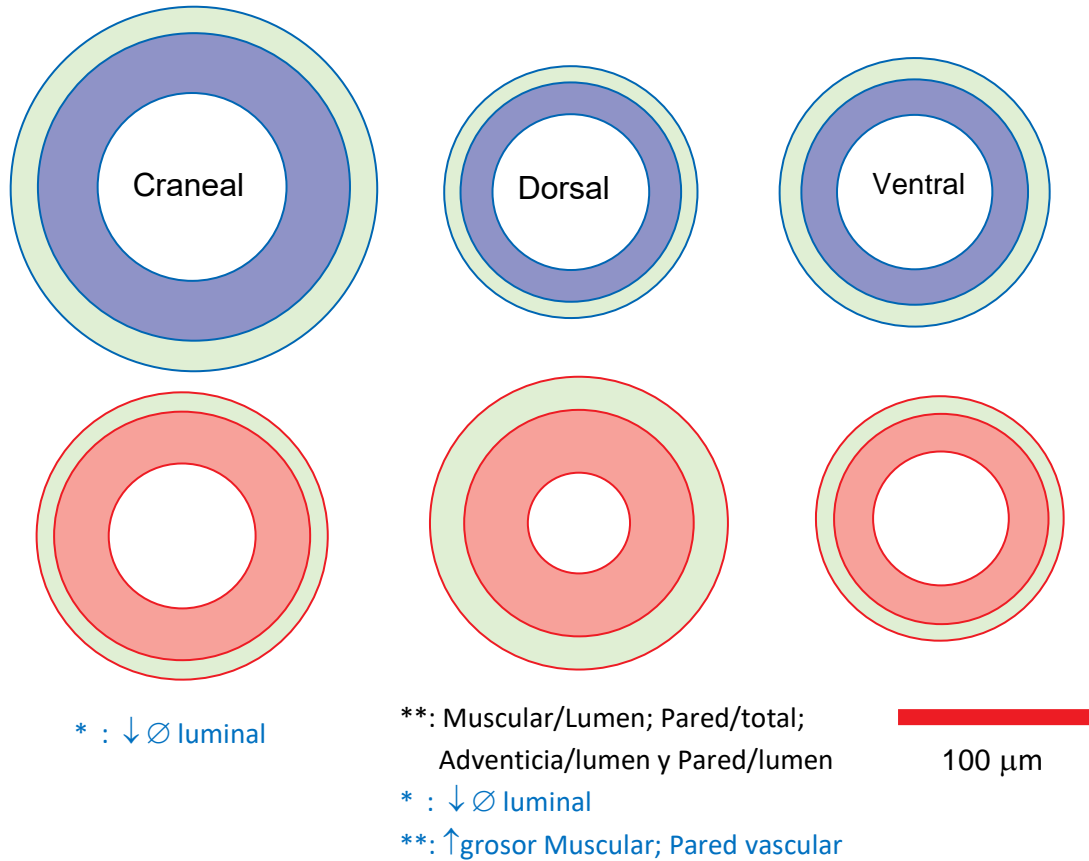


Figura 12. Representación esquemática a escala de vasos pulmonares pequeños. Las figuras representan las ratas expuestas a HIA (en blanco, naranja y verde) y sus controles NA (en blanco, celeste y verde). Se observa engrosamiento de pared vascular y reducción luminal en dorsales de ratas expuestas a hipoxia hipobárica aguda vs sus controles NA. Se indican las razones y componentes comprometidos. Diferencias significativas ($p < 0,05$): *vs NA; ($p < 0,01$):** vs NA HIA $n=5$.

Diámetros y grosores de arterias medianas

Se estudiaron los diámetros lumenales y vasculares, así como los grosores de capas media, adventicia y pared de AP medianas (250-600 μm). El grupo HIA presentó un engrosamiento de la adventicia en las arterias de ubicación ventral y una disminución de ésta en dorsal como se aprecia en Figs. 13 A-D.

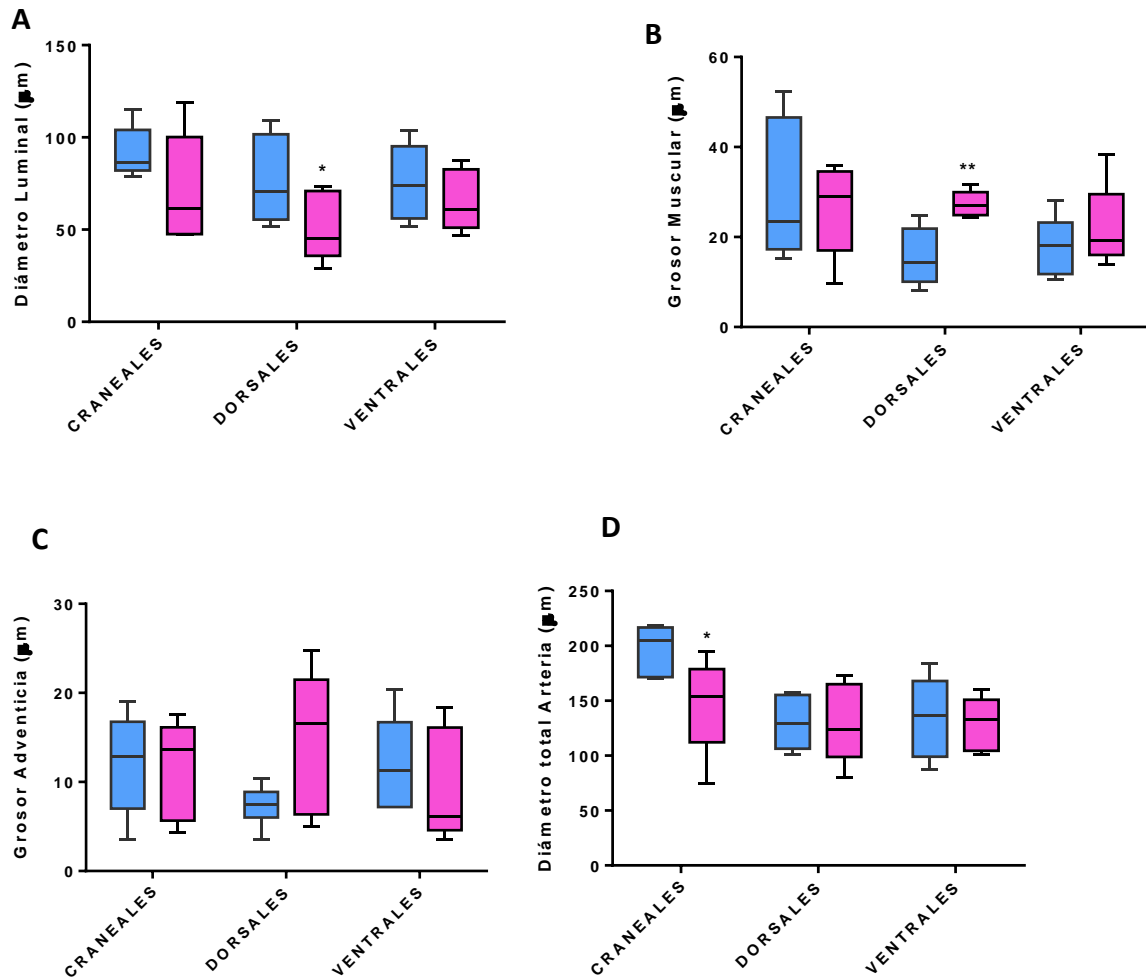


Figura 13. Mediciones de componentes de AP Medianas (250-600 μm) en diversas regiones pulmonares. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes el diámetro luminal (A), grosor de la túnica muscular (B), grosor de la túnica adventicia (C); y diámetro vascular total (D) en μm . Los grupos son ratas normobáricas agudas (NA, celestes; n=6) y ratas expuestas a 4 ciclos de Normobaría/Hipobaría (HIA, rosadas; n=6). Diferencias significativas ($p < 0,05$): * vs NA.

Razones entre componentes de arterias medianas

Para determinar la relación de los cambios y su proporcionalidad, se calcularon las razones entre los componentes de AP medianas. Todas las razones de los componentes estructurales fueron mayores en AP medianas ventrales. Por el contrario, en dorsales sólo hubo una disminución de razón adventicia/lumen en los animales HIA (Figs. 14 A-D).

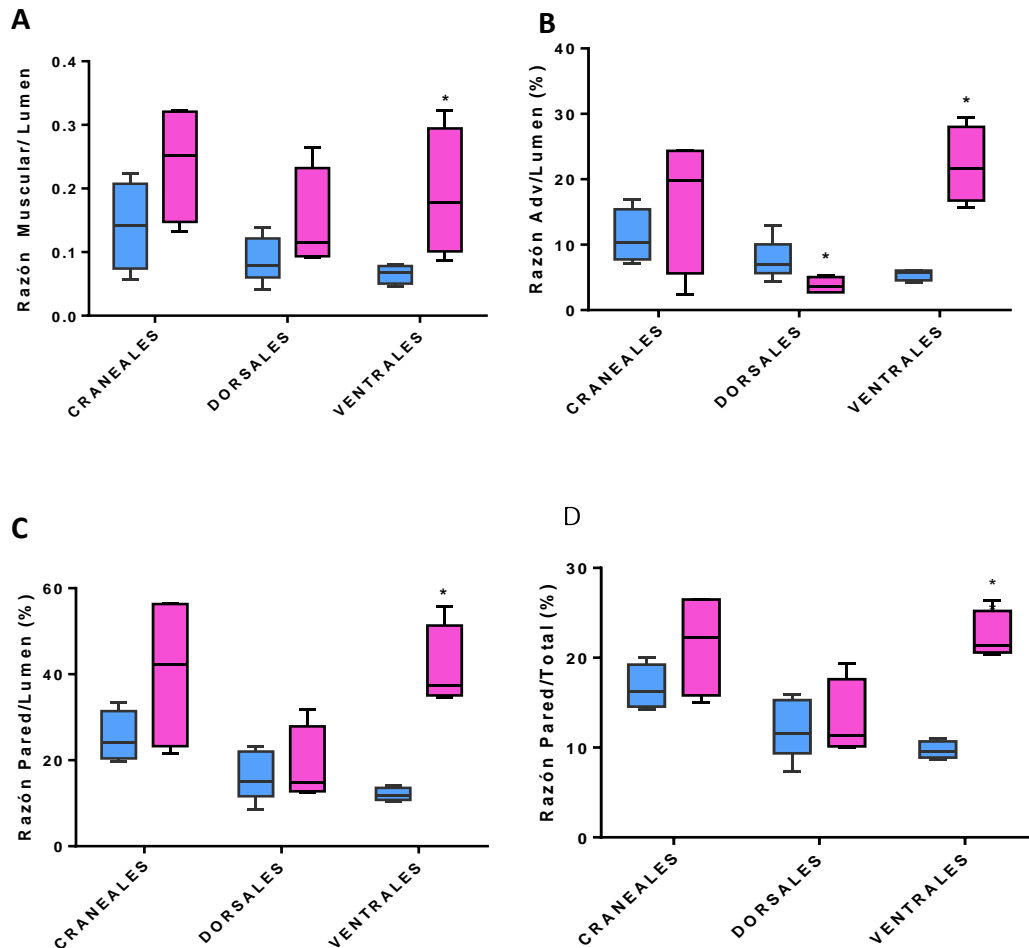


Figura 14. Razones entre componentes de arterias medianas (250-600 μ m) en diversas regiones pulmonares. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes a razón músculo vs lumen (A), razón adventicia vs lumen (B), razón pared vs lumen (C), y razón pared vs diámetro total (D). Los grupos son ratas normobáricas agudas (NA, celestes; n=6) y ratas expuestas a 4 ciclos de Normobarria/Hipobarria (HIA, rosadas; n=6). Diferencias significativas ($p < 0,05$): * vs NA.

Representación Gráfica de AP Medianas y remodelamiento subsecuente en HIA

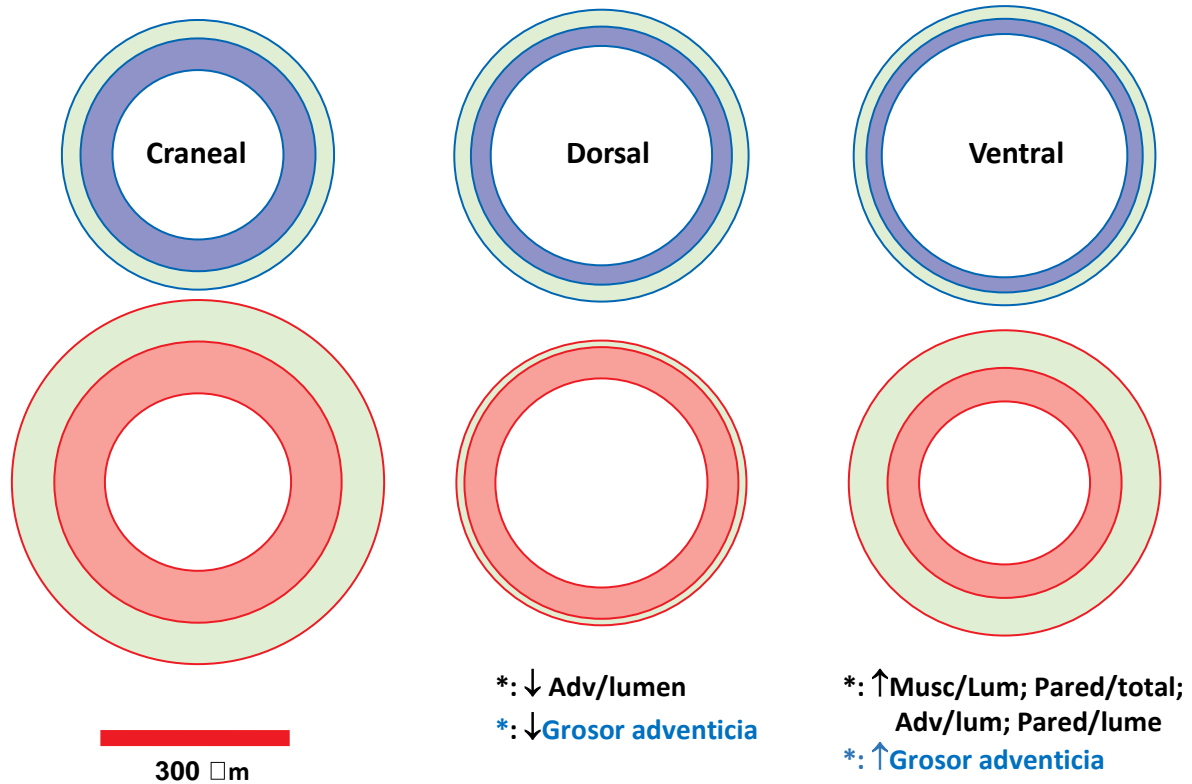
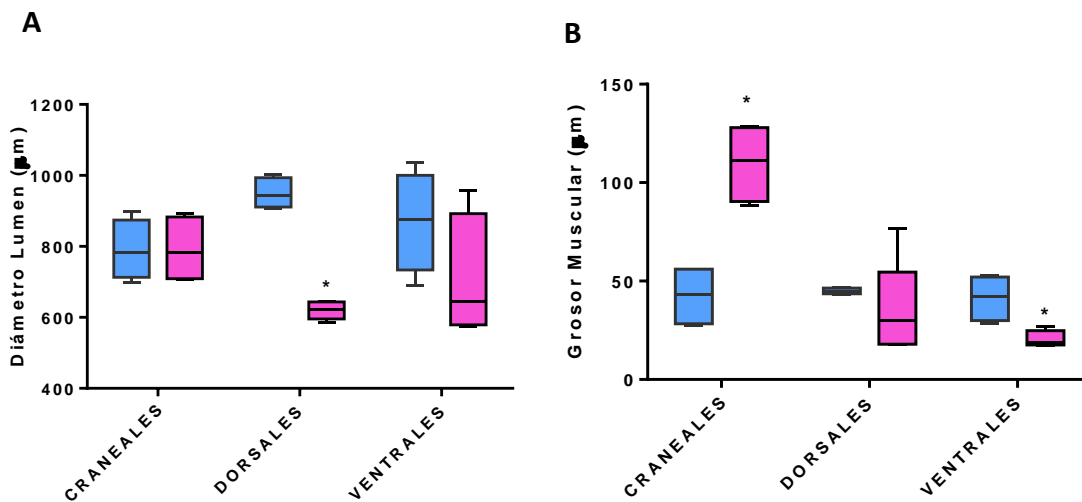


Figura 15. Representación esquemática a escala de AP Medianas (250-600 μ m). Los grupos son ratas expuestas a HIA (en blanco, naranja y verde) y sus controles NA (en blanco, celeste y verde). Se observa engrosamiento de pared vascular en ubicación ventral por aumento grosor de capa adventicia. Lo contrario ocurre en dorsales de ratas HIA respecto a sus controles NA. Se indican las razones y componentes comprometidos en cada ubicación.

Diámetros y grosores de arterias grandes

Se estudiaron los diámetros lumenales y vasculares, así como los grosores de capas media, adventicia y pared de AP grandes (600- 1500 μm) del grupo HIA y sus respectivos controles. Hubo aumento de grosores de muscular (Fig.16 B), adventicia (Fig.16 C) y pared en arterias de ubicación craneal (Fig.16 C). Sin embargo, en arterias de ubicación dorsales, se observó una disminución del lumen (Fig.16 A), del espesor de la adventicia (Fig.16 C) y del diámetro vascular externo en el grupo HIA (Fig.16 D). En contraste, las de ubicación ventrales sólo presentaron una disminución del espesor de la capa muscular, respecto a controles respectivas (Fig.16 B).



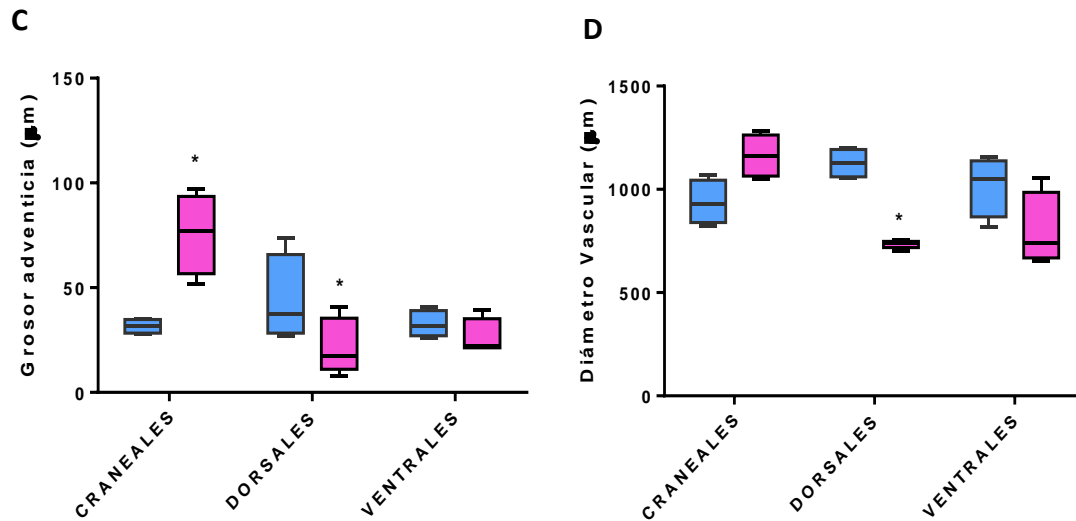
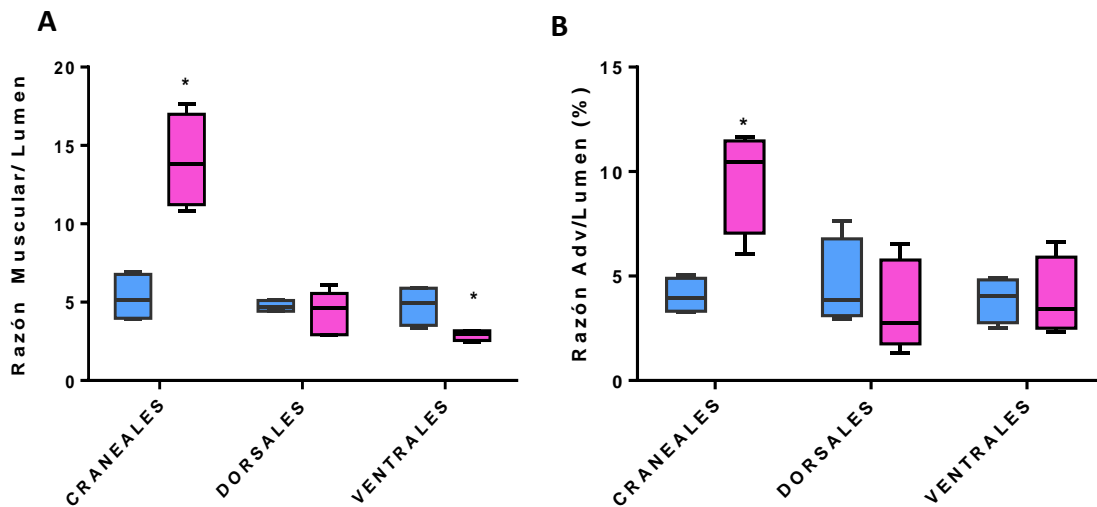


Figura 16. Medición de componentes de AP Grandes (600-1500 µm) en diversas regiones pulmonares. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes de diámetro del lumen (A), grosor de la capa muscular (B), grosor de la túnica adventicia (C), y diámetro vascular total (D) en µm. Los grupos son ratas normobáricas agudas (NA, celestes; n=6) y ratas expuestas a 4 ciclos de Normobaria/Hipobaría (HIA, rosadas; n=6). Diferencias significativas ($p < 0,05$): * vs NA; ($p < 0,01$): ** vs NA.

Razones entre componentes de arterias grandes

Se estudió la correlación porcentual entre de componentes vasculares y los diámetros lumenales o vasculares de AP grandes (600- 1500 μm) del grupo HIA respecto a sus respectivos controles. Hubo aumento de razones porcentuales en: Muscular /lumen (Fig. 17 A), grosor capa Adventicias / lumen (Fig. 17 B), grosor pared / lumen (Fig. 17 C) y grosor de pared / diámetro vascular total (Fig. 17 D) en la ubicación craneal del grupo HIA vs NA. Así también, hubo reducción de razón muscular/lumen en ventrales (Fig. 17 A).



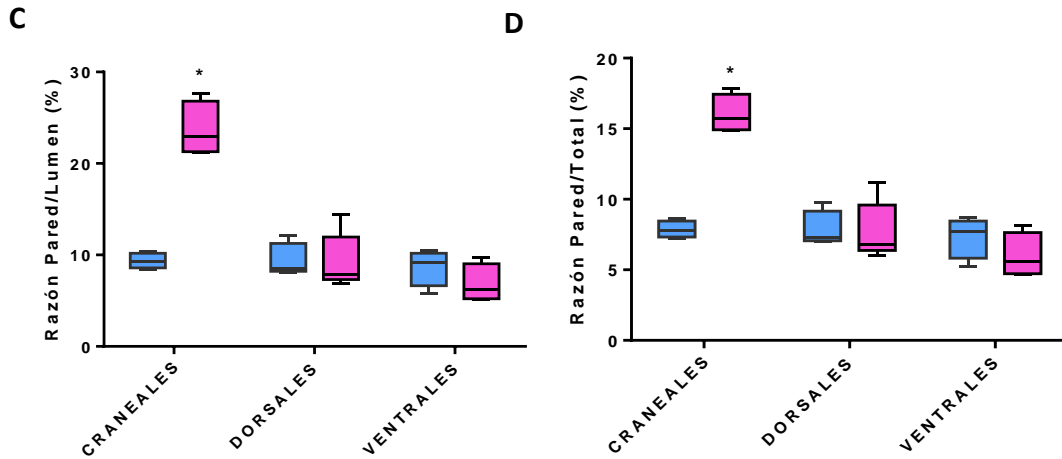


Figura 17. Razones de componentes de AP Grandes (600-1500 μ m) en diversas regiones pulmonares. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes de la razón músculo vs lumen (A), la razón adventicia vs lumen (B), la razón pared vs lumen (C), y la razón pared vs diámetro total (D). Los grupos son ratas normobáricas agudas (NA, celestes; n=6) y ratas expuestas a 4 ciclos de Normobaria/Hipobaría (HIA, rosadas; n=6). Los datos son expresados en promedio \pm EEM. Diferencias significativas ($p < 0,05$): * vs NA

Representación Gráfica de AP Grandes y remodelamiento subsecuente en HIA

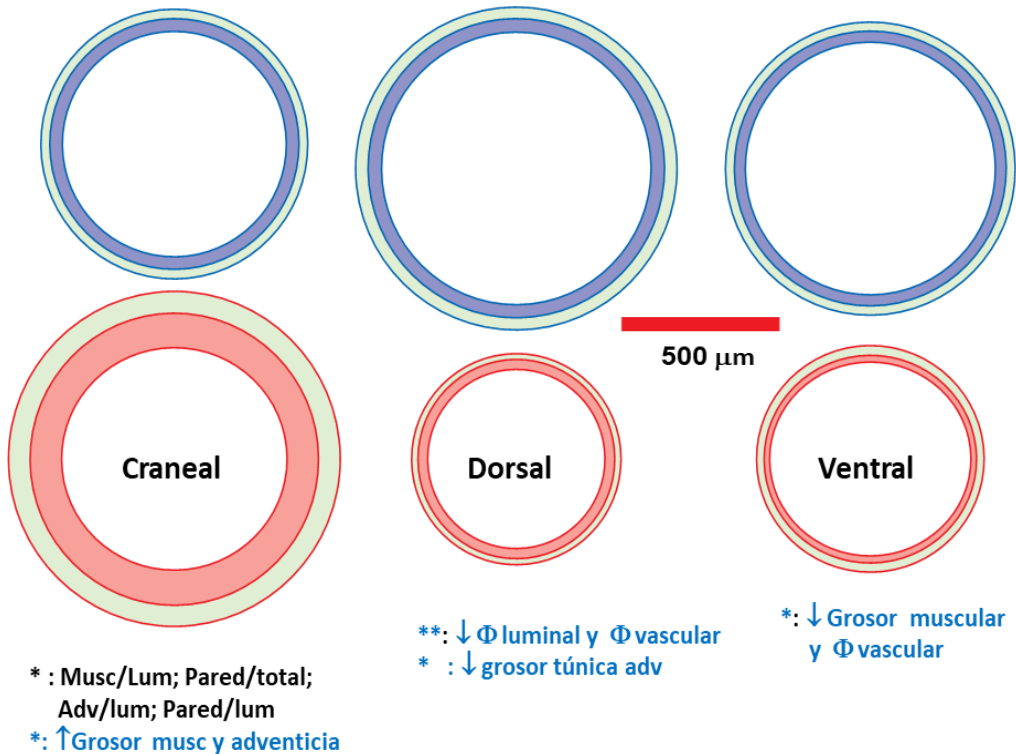


Figura 18. Representación esquemática a escala de vasos pulmonares grandes (600-1500 μm). Los grupos son ratas expuestas a HIA (en blanco, naranja y verde) y sus controles NA (en blanco, celeste y verde). Se observa engrosamiento de pared vascular en craneales. Por el contrario, en dorsales y ventrales, hubo menor tamaño vasculares en ratas HIA vs sus controles NA. Se indican las razones y componentes comprometidos en cada ubicación.

RESULTADOS

EXPOSICIÓN A HIPOXIA HIPOBÁRICA INTERMITENTE CRÓNICA (HIC)

Peso corporal

Las ratas sometidas a hipoxia HIC no presentaron diferencias en sus pesos corporales con respecto a sus controles normóxicas al final del 12º ciclo de hipoxia/normoxia (Fig.12). No obstante, hubo una caída del peso en el 1º ciclo en ratas HIC ($p= 0,0022$) ** vs NC, tras lo cual se equilibra la diferencia. Además, se observa una nueva baja de peso entre los ciclos 7º a 9º, lo que se equilibra nuevamente a partir del siguiente ciclo (Fig. 19).

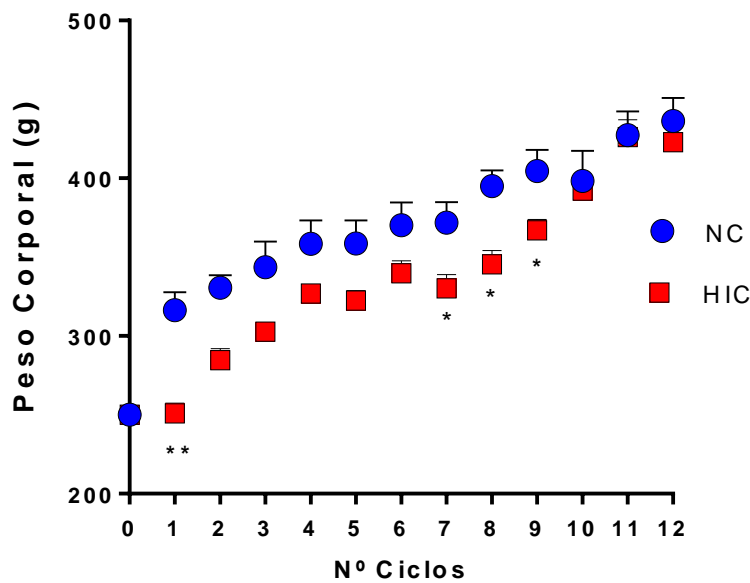


Figura 19. Peso corporal en ratas HIC y controles NC. Las ratas fueron pesadas al finalizar cada uno de los 12 ciclos experimentales de normobaria/hipobaria. Los datos se expresan en promedios \pm ESM (g). Los grupos son ratas normóxicas crónicas (NC, azul, $n=6$) y ratas expuestas hipoxia hipobárica crónica (HIC, rojo, $n=6$). Diferencias significativas: ($p < 0,05$) = * vs NC; ($p < 0,01$) = ** vs NC.

Peso corporal y pulmonar post mortem

No hubo diferencias significativas en los pesos corporales post-mortem de ratas HIC vs sus controles NC. No obstante, los pesos pulmonares húmedos de ratas HIC fueron mayores respecto a ratas NC. Por consiguiente, hubo mayor relación % PP / PC al comparar hipóxicos HIC vs sus controles crónicos (Tabla 3).

Tabla 3. Pesos corporales (PC) y pulmonares húmedos (PP) y su relación porcentual (PP/PC*100).

| Exposición a 12 ciclos HHI | NC | HIC |
|-----------------------------------|--------------------|-----------------------|
| Pesos Corporales (PC), g | 436 ± 15 | 423 ± 14 |
| Pesos Pulmonares (PP), g | 2,3 ± 0,1 | 3,1 ± 0,2 ** |
| Razón % PP / PC | 0,53 ± 0,10 | 0,73 ± 0,10 ** |

Las mediciones se realizaron con peso húmedo en gramos (g) al final del 12^o ciclo (post mortem) y la razón porcentual medido de acuerdo al PC final. Los datos fueron expresados en medias ± *EEM*. Diferencias significativas (p < 0,01) =** vs NC; NC n= 6 HIC n= 6.

Expresión de Enzimas Antioxidantes

No hubo diferencias significativas entre las expresiones de Mn-SOD (Fig. 20 A), CAT (Fig. 20 B) y GPx-1 (Fig. 20 C) en ratas del grupo HIC y sus respectivos controles (NC).

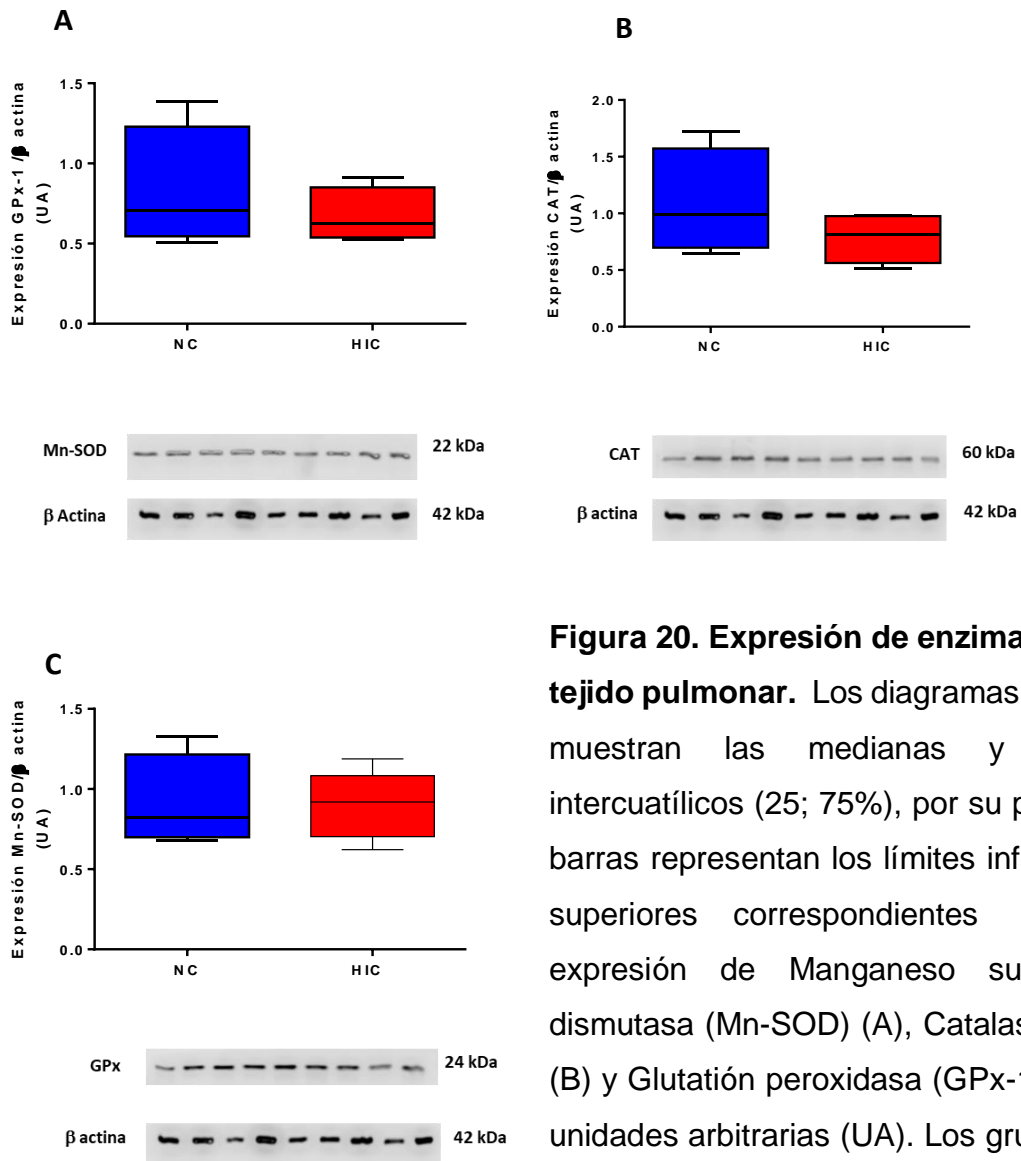


Figura 20. Expresión de enzimas AO en tejido pulmonar. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes de la expresión de Manganese superóxido dismutasa (Mn-SOD) (A), Catalasa (CAT) (B) y Glutación peroxidasa (GPx-1) (C) en unidades arbitrarias (UA). Los grupos son ratas normóxicas crónicas (NC, azul; n=4) y ratas expuestas a 12 ciclos de normobaría/hipobaría (HIC, roja; n=5).

Expresión del Factor Inducible por Hipoxia

La expresión de HIF-1 (Fig. 21 A) y HIF-2 (Fig. 21 B) en tejido pulmonar en ratas expuestas a hipoxia HIC, inesperadamente fue similar respecto a NC.

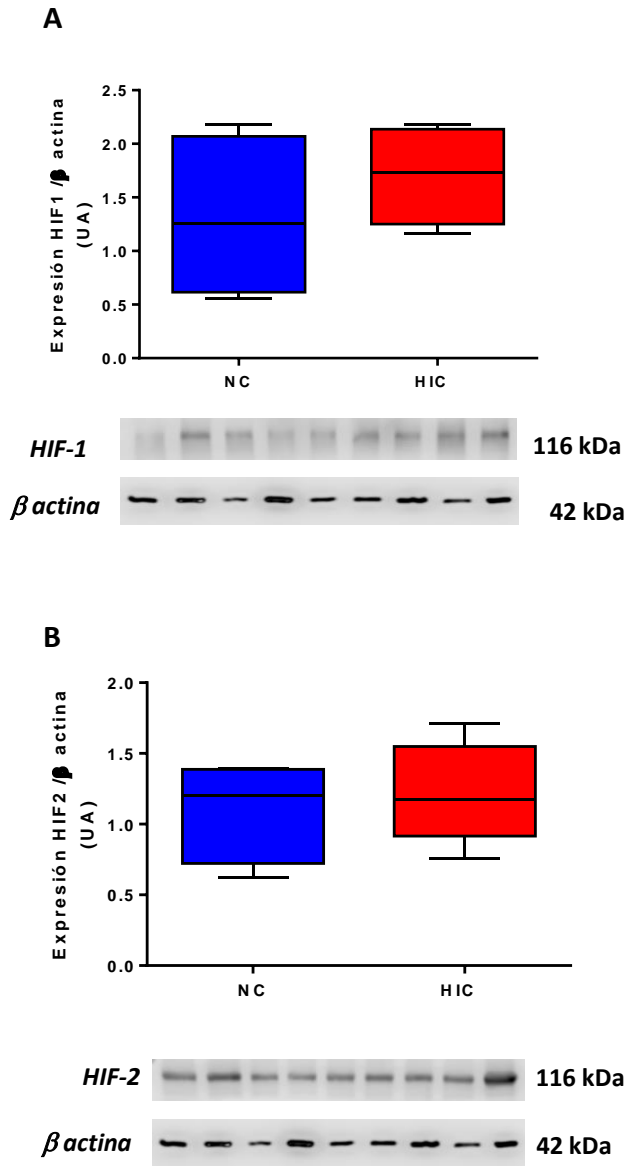


Figura 21. Expresión de Factor inducible por hipoxia. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes de expresión de HIF-1 (A) y HIF 2 (B) en ratas HIC y controles NC en unidades arbitrarias (UA). Los grupos son ratas normóxicas agudas (NC, azul; n=4) y ratas expuestas a 12 ciclos de normobaría/hipobaría (HIC, roja; n=5).

Actividad de las Enzimas Antioxidantes

La enzima antioxidante Catalasa mostró menor actividad en el grupo HIC ($p = 0,0317$) * vs NC (fig. 22 B). Por el contrario, la actividad SOD y GPx no observó cambios (Fig. 22 A, C) como era esperado en esta investigación.

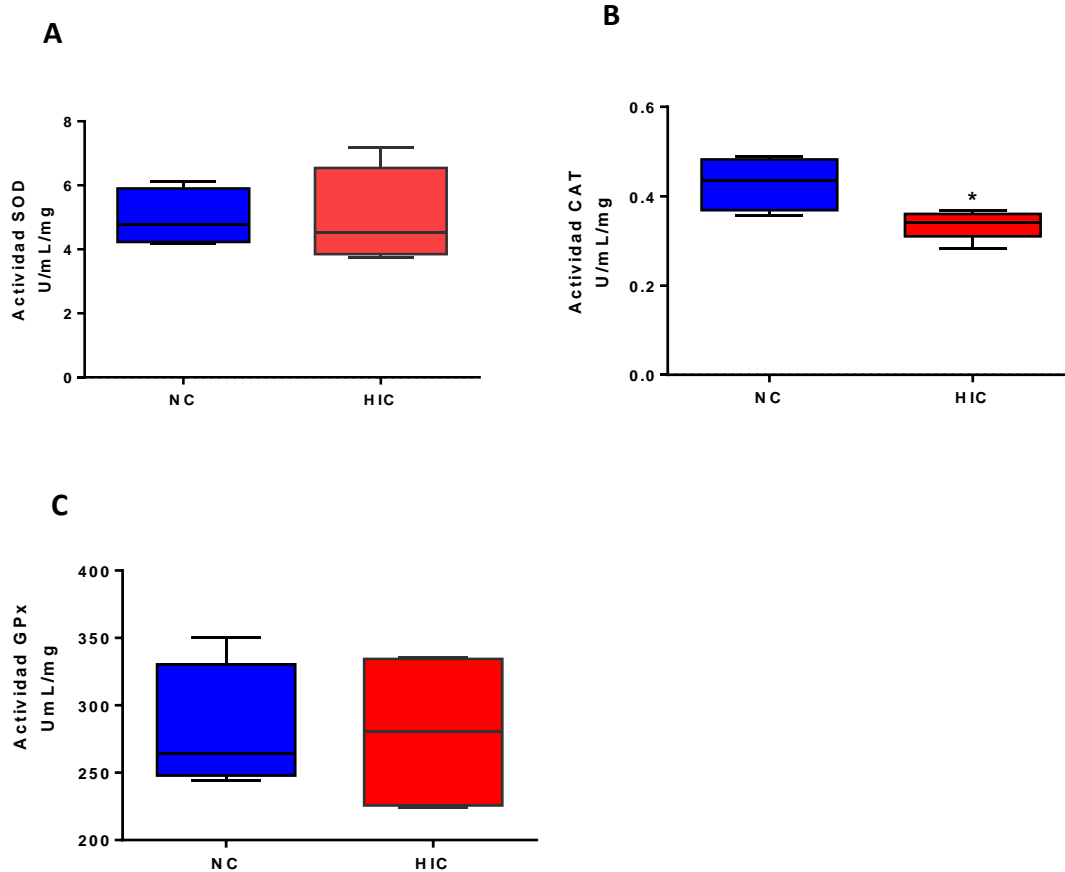


Figura 22. Actividad de enzimas antioxidantes. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes de actividad de SOD (A), CAT (B) y GPx (C) en ratas HIC y controles NC en U/mg proteína. Los grupos son ratas normóxicas crónicas de 6 meses de edad (NC, azul; n=4) y ratas expuestas a 12 ciclos de normobaría/hipobaría (HIC, rojo; n=5). Diferencia significativa: $p < 0, 05$: * vs NC.

Marcadores de estrés oxidativo

La relación GSSG / GSH no mostró cambios en tejido pulmonar de ratas expuestas a HIC en relación a ratas normóxicas crónicas (Fig. 23 A). En contraste, la reacción del tejido pulmonar con ácido tiobarbitúrico (TBARS) de ratas HIC fue mayor ($p = 0,0079$) ** vs NC (Fig. 23 B).

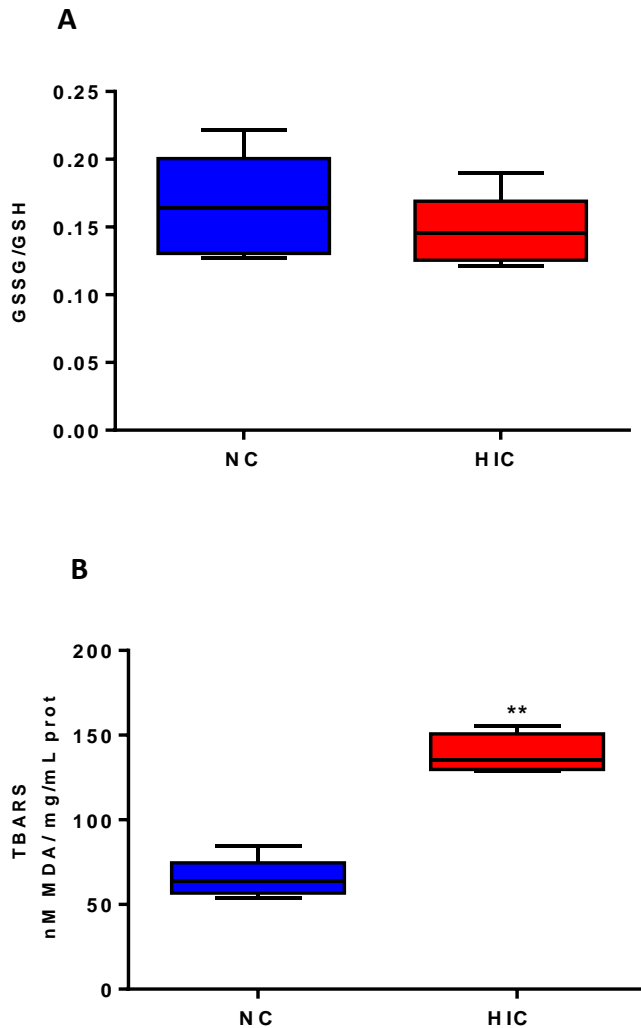


Figura 23. Marcadores de estrés oxidativo. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes a índice GSSG/GSH (A) y niveles TBARS en tejido pulmonar (B) en nM MDA / mg proteína. Los grupos son ratas normóxicas crónicas (NC, azul; n=5) y ratas expuestas a 12 ciclos de normobaria/hipobaria (HIC, rojo; n=5). Diferencias significativas: ($p < 0, 01$) = ** vs NC.₅₂

PARÁMETROS HISTOMORFOLÓGICOS

Diámetros y grosores de arterias pequeñas

En los diámetros y grosores de arterias pequeñas no hubo cambios significativos en ratas expuestas a hipoxia HIC respecto a sus controles crónicas, como se aprecia en Figs. 24 A-D.

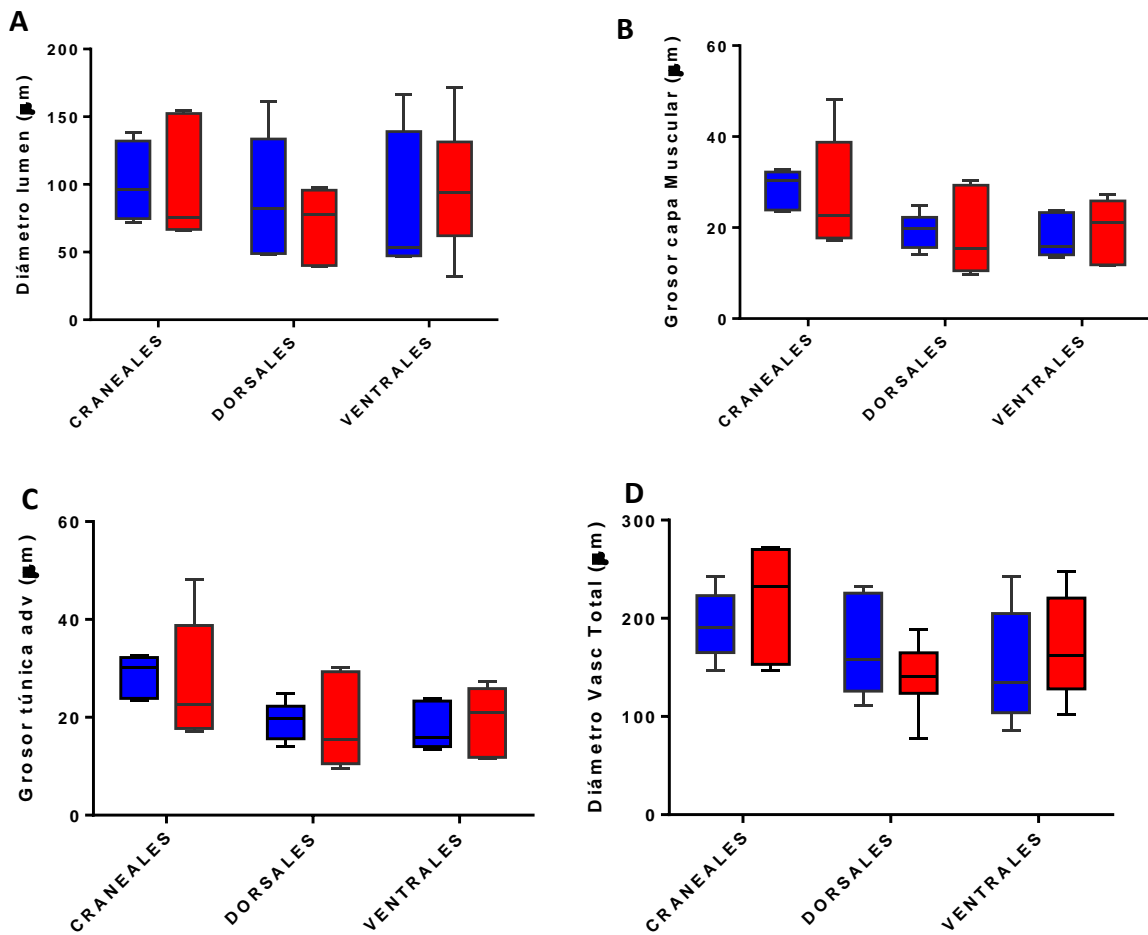


Figura 24. Características morfológicas de arterias pequeñas (< 250 μm) en diversas regiones pulmonares. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes de diámetro Luminal (A); espesor de la pared muscular (B); espesor de la túnica adventicia (C); y el diámetro vascular total (D) en μm. Los grupos son ratas normobáricas crónicas (NC, azules; n=6) y ratas expuestas a 12 ciclos de Normobaría/Hipobaría (HIC, rojas; n=6). Sin diferencias significativas.

Razones entre componentes de arterias pequeñas

En la razones de **AP Pequeñas**, subsecuentemente respecto a los resultados precedentes no hubo diferencias significativas en las razones estudiadas de los vasos pulmonares pequeños de ratas expuestas a HIC vs sus controles NC, Figs. 25 A-D.

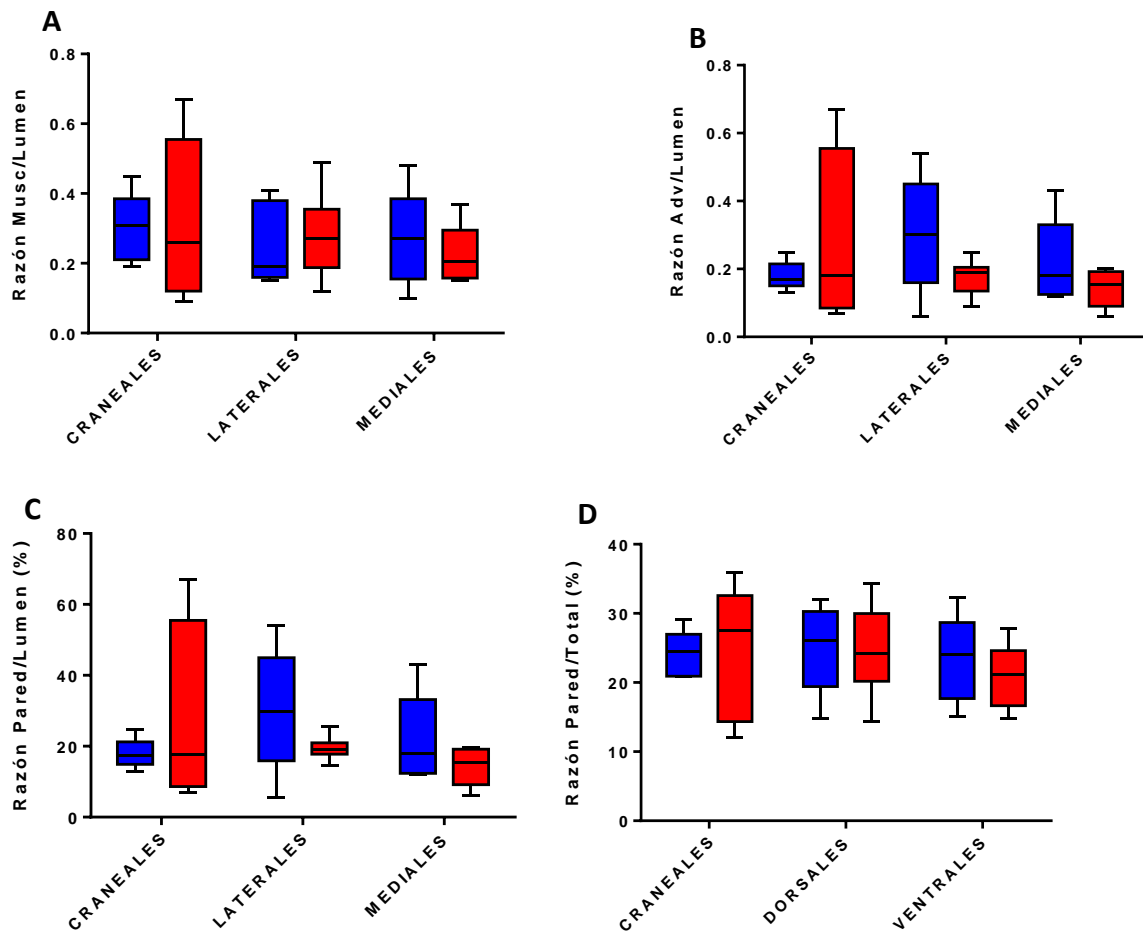


Figura 25. Razones de componentes de arterias pequeñas (< 250 μm) en diversas regiones pulmonares. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes a la razón espesor músculo vs diámetro lumen (A); razón espesor adventicia vs diámetro lumen (B); razón espesor de la pared vs Lumen (C); razón espesor pared vs diámetro total (D). Los grupos son ratas normobáricas crónicas (NC, azules; n=6) y ratas expuestas a 12 ciclos de Normobaria/Hipobaría (HIC, rojas; n=6). Sin diferencias significativas.

Representación Gráfica de AP Pequeñas sin remodelamiento subsecuente en HIC

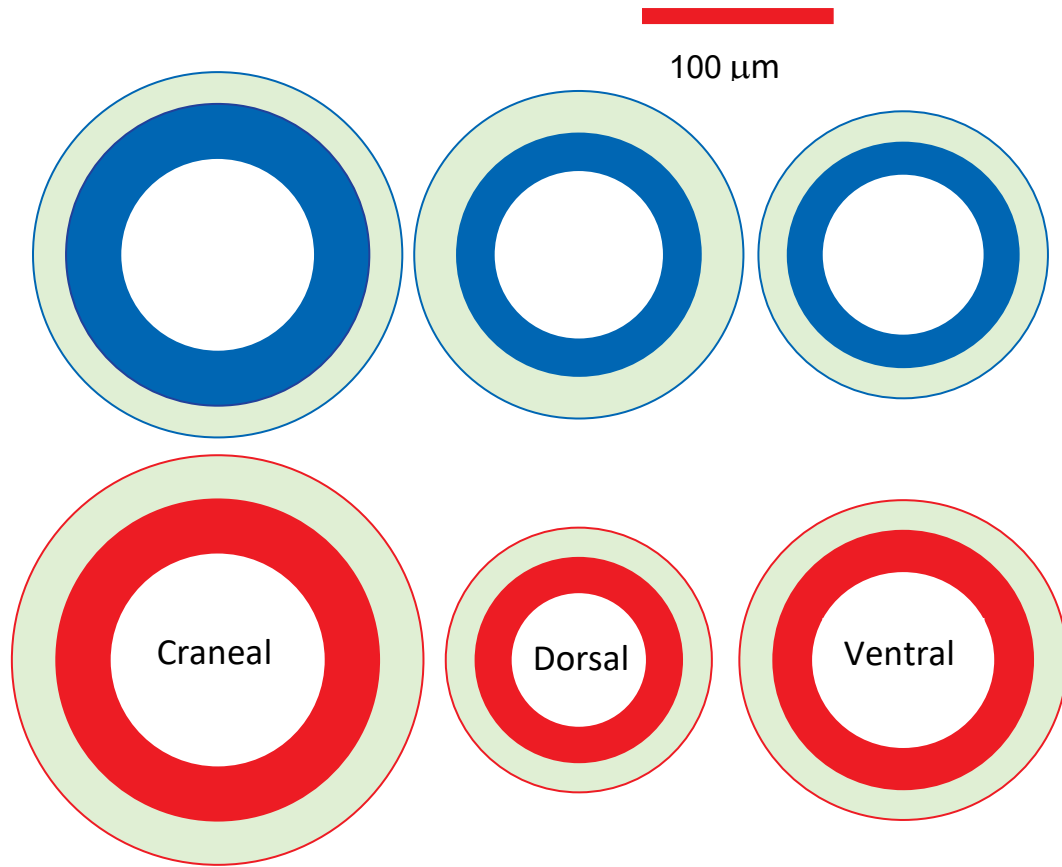


Figura 26. Representación esquemática a escala de vasos pulmonares pequeños (< 250 μ m) de ratas expuestas a HIC (en blanco, rojo y verde) y sus controles NC (en blanco, azul y verde). No se aprecian diferencias significativas de sus componentes ni de razones respectivas entre los grupos estudiados.

Diámetros y grosores de arterias medianas

En los diámetros y grosores AP medianas, hubo remodelamiento vascular dado por mayor grosor muscular, craneales ($p= 0,0286$) * vs NC, por ejemplo, similar a dorsales y ventrales, respecto a sus controles respectivos (Fig. 27 B) . Sin embargo, no hubo cambios significativos en los otros componentes (Fig. 27 A-D).

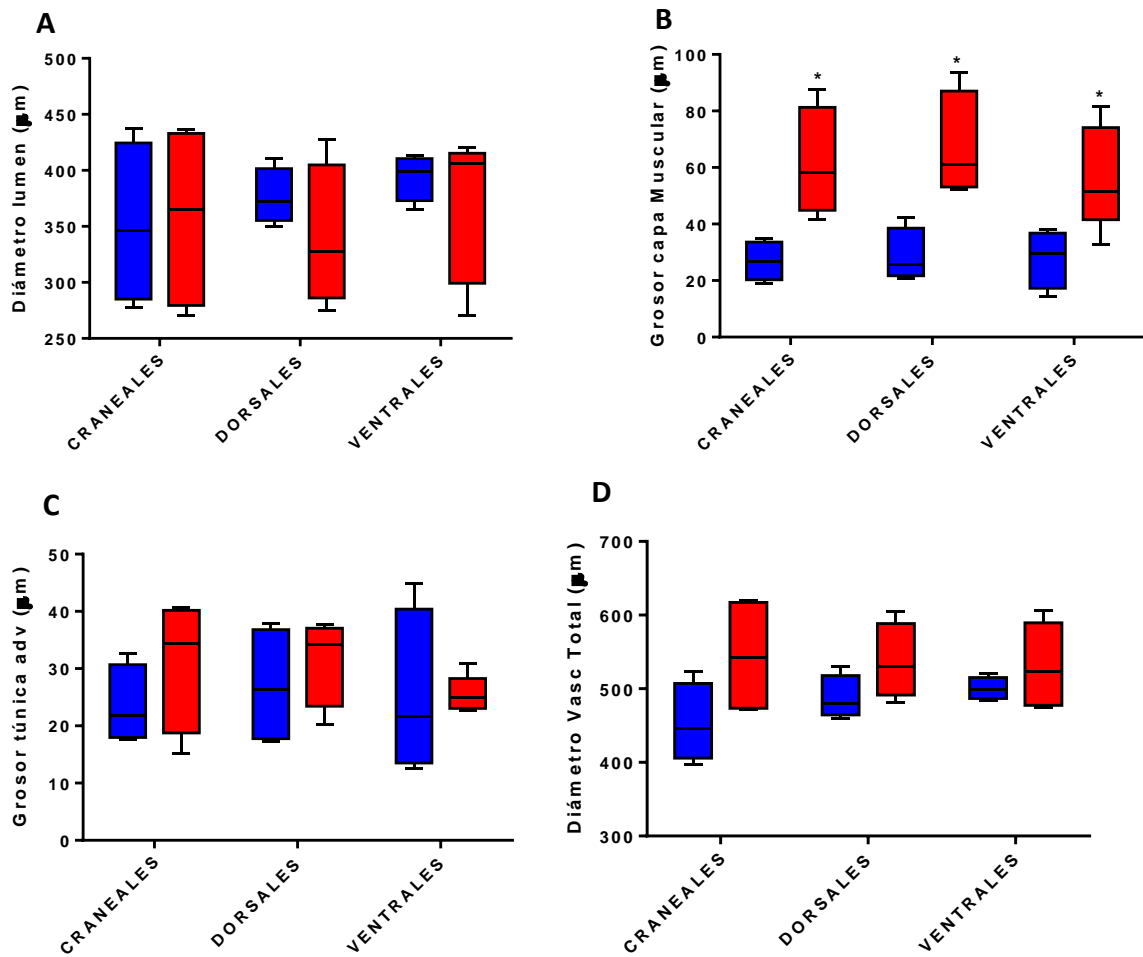


Figura 27. Componentes de a. pulmonares medianas (250-600 μm). Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes a Diámetro Lumen (A); Grosor Pared Muscular (B); Grosor Túnica Adventicia (C); Diámetro Vascular Total (D) en μm . Los grupos son de arterias de ratas normobáricas crónicas (NC, azules; $n=6$) y ratas expuestas a 12 ciclos de Normobaria/Hipobaria (HIC, rojas; $n=6$). Diferencias significativas: ($p < 0,05$): * vs NC.

Razones entre componentes de arterias medianas

Dado los resultados alcanzados por engrosamiento de capa muscular (Fig 27 B), se incrementaron las razones % en muscular/lumen, pared / lumen y pared/ vaso total en craneales, dorsales y ventrales de ratas expuestas a HIC, respecto a los valores controles, NC.(Figs. 28 A-D)

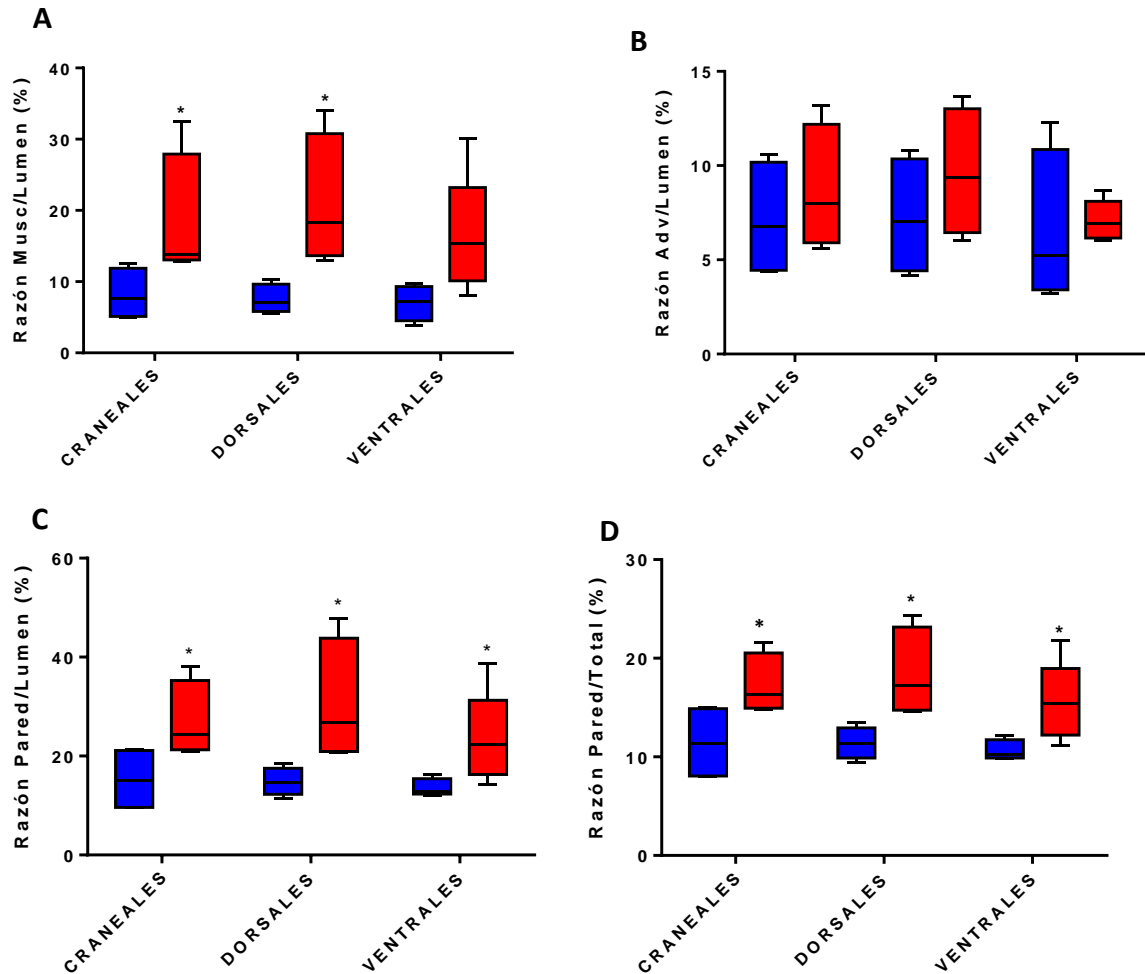


Figura 28. Razones de componentes de arterias medianas (250-600 μ m) en diversas regiones pulmonares. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes a razón espesor músculo vs diámetro lumen (A); razón espesor adventicia vs diámetro lumen (B); razón espesor de la pared vs Lumen (C); razón espesor pared vs diámetro total (D. Los grupos son ratas normobáricas crónicas (NC, azules; n=6) y ratas expuestas a 12 ciclos de Normobaría/Hipobaría (HIC, rojas; n=6). Diferencias significativas: (p < 0,05): * vs NC.

Representación Gráfica de AP Medianas y remodelamiento subsecuente en HIC

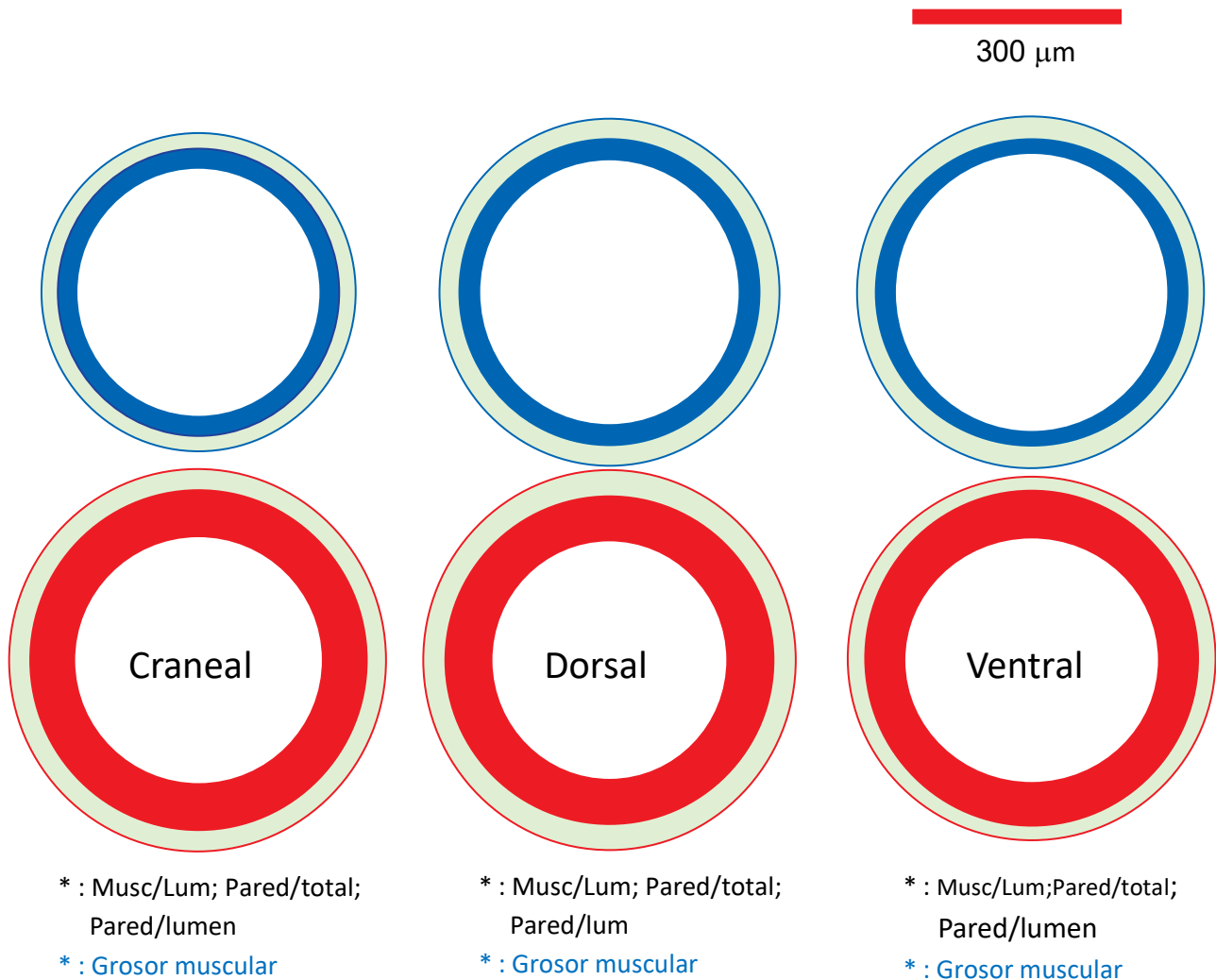


Figura 29. Representación esquemática a escala de vasos pulmonares medianos. Se representan las modificaciones observadas en arterias de 250-600 μ m de ratas expuestas a HIC (en blanco, rojo y verde) y sus controles NC (en blanco, azul y verde). Se observa engrosamiento de capas musculares y paredes vasculares en todas las ubicaciones estudiadas de ratas HIC vs sus controles NC. Se indican las razones y componentes comprometidos en cada ubicación.

Diámetros y grosores de arterias grandes

En estos componentes vasculares se observa un claro remodelamiento dados por aumento del grosor muscular en craneales, dorsales y ventrales. De la misma forma aumentó el grosor de túnica adventicia en dorsales y ventrales de ratas expuestas a HIC, respecto a los valores controles NC (Figs. 30 A-D).

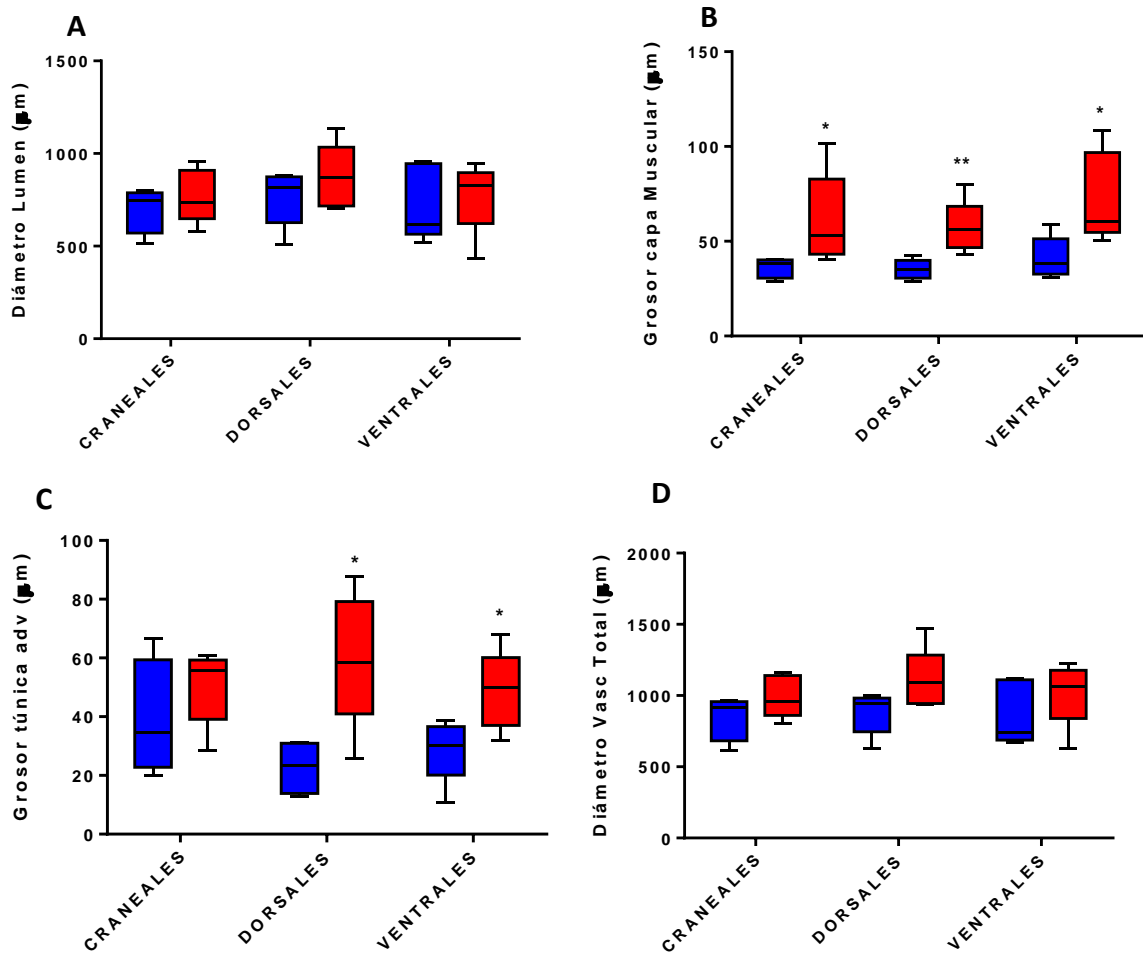


Figura 30. Características morfológicas de arterias grandes (600-1500 μm) en diversas regiones pulmonares. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes de diámetro Luminal (A); espesor de la pared muscular (B); espesor de la túnica adventicia (C); y el diámetro vascular total (D) en μm. Los grupos son ratas normobáricas crónicas (NC, azules; n=6) y ratas expuestas a 12 ciclos de Normobaria/Hipobaria (HIC, rojas; n=6). Diferencias significativas: *p< 0,05 vs. NC.

Razones entre componentes de AP grandes

Consecuente a resultados previos relacionados con componentes vasculares en proceso de remodelamiento, hubo aumento de razones % pared vs lumen y pared vs total en todas las localizaciones (Figs.31 C-D). Así también, hubo aumento de razón % Adventicia vs Lumen en AP dorsales (Fig. 31 B), y de la razón % muscular vs Lumen en ventrales (Fig. 31 A).

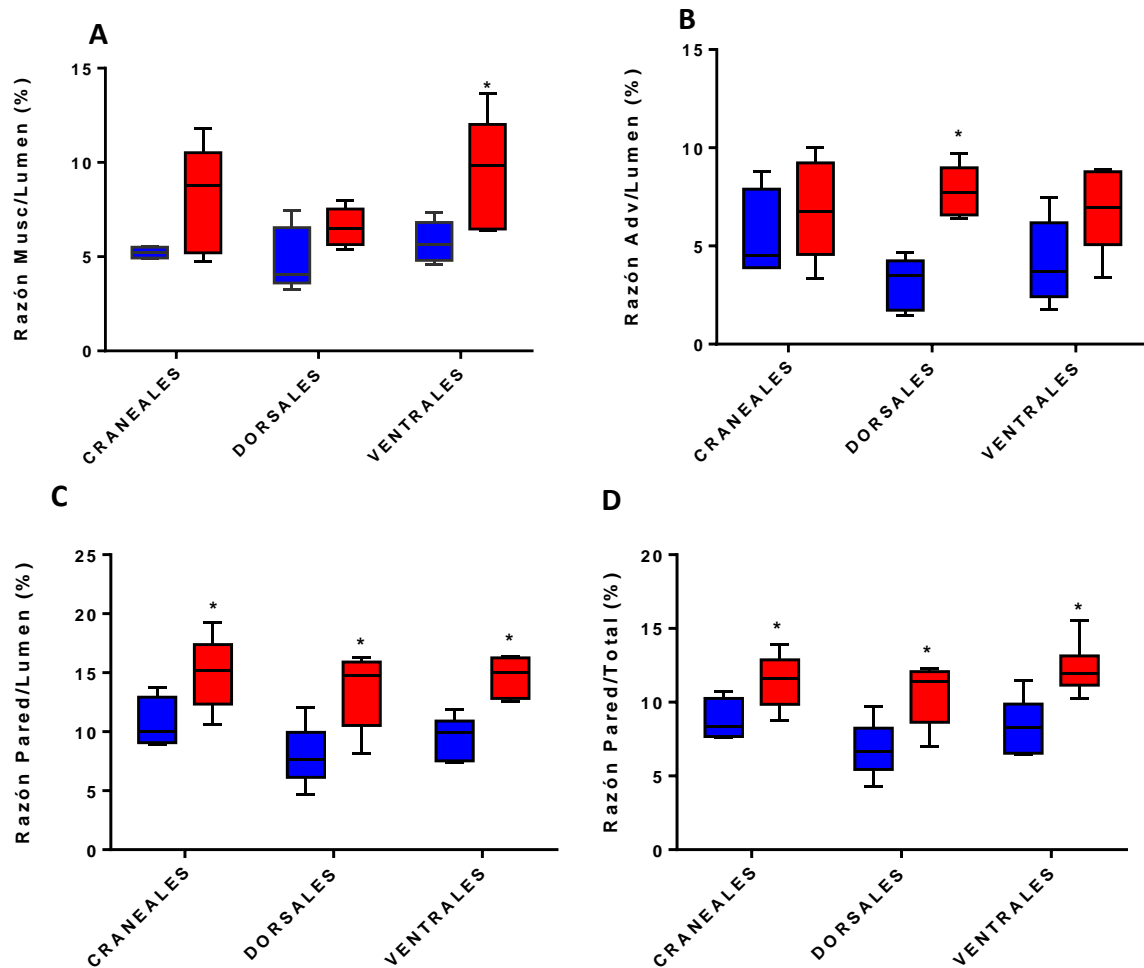


Figura 31. Razones de componentes de AP Grandes (600-1500 μ m) en diversas regiones pulmonares. Los diagramas de cajas muestran las medianas y rangos intercuatílicos (25; 75%), por su parte, las barras representan los límites inferiores y superiores correspondientes de la razón espesor músculo vs diámetro lumen (A); razón espesor adventicia vs diámetro lumen (B); razón espesor de la pared vs Lumen (C); razón espesor pared vs diámetro total (D). Los grupos son ratas normobáricas crónicas (NC, azules; n=6) y ratas expuestas a 12 ciclos de Normobaría/Hipobaría (HIC, rojas; n=6). Diferencias significativas: (p < 0,05): * vs NC.

Representación Gráfica de AP Grandes y remodelamiento subsecuente en HIC

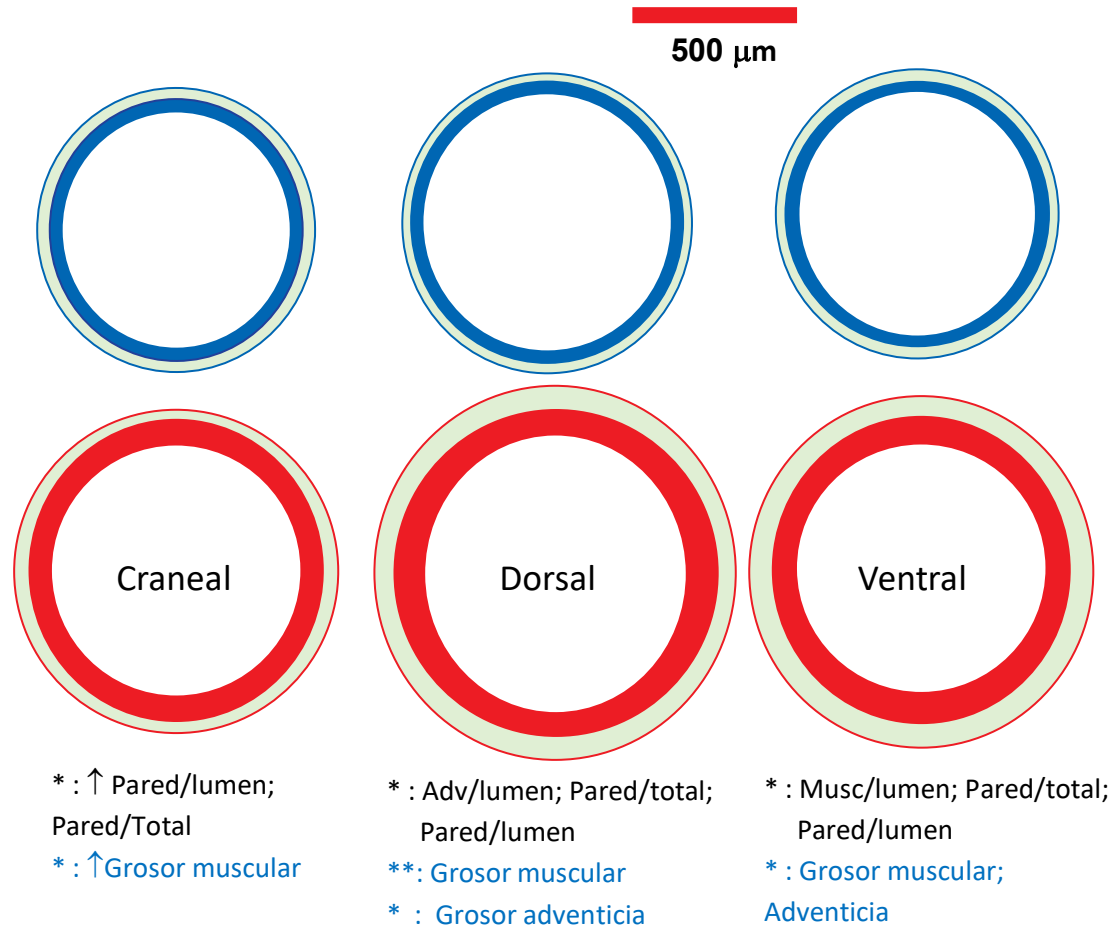


Figura 32. Representación esquemática a escala de vasos pulmonares grandes. Se representa las modificaciones observadas en arterias de 600-1500 μm de ratas expuestas a HIC (en blanco, rojo y verde) y sus controles NC (en blanco, azul y verde). Hubo aumento grosor muscular en craneales y ventrales, por otra parte, las dorsales aumentaron el grosor de túnica adventicias. Se indican los componentes y razones comprometidas en cada ubicación estudiada.

DISCUSIÓN

En este estudio hemos demostrado que la hipoxia intermitente tiene un efecto diferencial en pulmón dependiente de la cantidad de ciclos de exposición. Específicamente, hemos demostrado que un desbalance pro-oxidante pulmonar se modifica con leves cambios en la expresión y/o actividad enzimática antioxidante. Es más, la circulación pulmonar se ve afectada por importantes cambios histomorfológicos, los cuales sugieren una mayor contribución del componente hipertensivo pulmonar en los animales expuestos a HHI. Nuestros hallazgos muestran además efectos diferentes según el tiempo de exposición, sin modificar la intensidad de la hipoxia. Además, este estudio es un gran avance en entender los eventos fisiopatológicos que afectan la circulación pulmonar en ciclos sucesivos de normobaría/hipobaría intermitente.

Efectos de la hipoxia hipobárica intermitente sobre peso corporal.

El llegar a alta altitud produce baja de peso dado por una disminución de ingesta de alimentos y agua [42]. Este hecho se ha observado tanto en animales como en humanos. En nuestro modelo experimental en hipoxia hipobárica intermitente observamos una baja del peso corporal inicial, tanto en exposición agudas como en crónica, verificadas por disminución de ingesta de alimento (reducción porcentual: 27 ± 2 , en ambas exposiciones), sin embargo no hubo reducción de ingesta de agua (adipsia). El peso del alimento fue medido después de la exposición a hipobaría, así como después del descanso en normobaría, interesantemente, en este último fue aún menor la ingesta porcentual (30 ± 2). Por tanto, el estímulo inhibitorio persistió en normobaría. Este fenómeno es aparentemente limitado, pues en ambas exposiciones experimentales aumentaron la ingesta a partir del segundo ciclo, con lo cual incrementaron su peso corporal equilibrándose respecto a sus controles. En concordancia con nuestros resultados, estudios atribuyen la baja de peso corporal a disminución de apetito, así como a incremento de la tasa metabólica basal (TMB) debido a que hipobaría aumenta HIF-1, el que induce mayor gasto

energético y cambio en el flujo metabólico (desde fosforilación oxidativa a glicolítica). Además, este factor transcripcional puede inducir en RNA los niveles de leptina, mejorando su sensibilidad y subsecuente, reducción del apetito, facilitando la pérdida de peso por aumento del gasto energético [43]. La leptina es una hormona derivada de los adipocitos que circula en concentración directamente proporcional a la masa grasa del sujeto, atraviesa la barrera cerebro-vascular en el núcleo arqueado del hipotálamo donde estimula neuronas POMC (proopiomelanocortina) [44]. Esta unión induce la hormona estimulante de melanocitos α (MSH- α) que media la señalización de leptina en el núcleo paraventricular, produciendo anorexia, aumento de gasto energético y de la actividad del sistema nervioso simpático. Importantemente, la baja de peso corporal *per se* reduce los niveles de leptina debido a que esta es secretada por células adiposas [45]. Otros factores relacionados a la baja de peso incluyen alteración de la función intestinal e incrementos de citoquinas inflamatorias (IL-6), aumento de requerimientos hídricos dado mayor ventilación, entre otros [4].

Efectos de la hipoxia hipobárica intermitente sobre peso pulmonar húmedo.

Un hallazgo interesante *encontrado* en este trabajo, es el mayor peso húmedo pulmonar *post mortem* en la exposición a hipoxia hipobárica crónica, lo que probablemente sea secundario a edema pulmonar. Hipoxia produce vasoconstricción de la AP y mientras persista, se mantiene la alta resistencia vascular lo que deriva en un mecanismo de edema producto del aumentado gradiente de presión hidrostática entre el espacio vascular y el intersticial. En esta exposición, HIC, hubo mayor remodelamiento de arterias pulmonares medianas y grandes. Se verificó un aumento del grosor de la pared vascular dado por la suma de la capa muscular y la túnica adventicia, ambas engrosadas. Esto se debe a hiperplasia e hipertrofia celular y no celular, matriz extracelular (colágeno, fibronectina, elásticas, entre otros), la cual infiltraría los diversos componentes de la pared [46]. Se ha observado que en hipoxia las fibras de colágeno se condensan entre las CMLAP aumentando la rigidez de las paredes vasculares comprometidas,

alterando su impedancia con pérdida del estado pulsátil del diástole [47]. Esto disminuye el *shear stress* laminar con subsecuente reducción de generación de NO. Este conjunto de transformaciones estructurales y fisiopatológicas conducirían secuencialmente a hipertensión capilar pulmonar, aumento de la permeabilidad vascular y edema pulmonar, como ocurrió en ratas HIC. Finalmente, este fenómeno pulmonar repercutiría en el sistema cardiovascular, dado por aumento de la postcarga de VD, que induciría, junto a otros estímulos gatillados por hipobaria crónica (estrés oxidativo, inflamación, etc) en remodelamiento del ventrículo derecho y subsecuente disfunción [48]. Además, se ha descrito que en hipoxia crónica existe un gran número de mediadores inflamatorios en LBA (por ejemplo, IL-1, TNF α , IFN γ , entre otros) y moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y P-selectina) [49]. Todos ellos junto al VEGF promueven el aumento de la permeabilidad vascular endotelial, lo que también favorece un paso de líquido intravascular al espacio intersticial, como otro tipo de edema vasogénico. Interesantemente, el edema pulmonar se manifiesta en la exposición crónica, pero no en la aguda, demostrando que probablemente existen mecanismos compensatorios efectivos en los primeros ciclos de exposición (mecanismo adaptativos). Un ejemplo de ello es el estrés tangencial por aumento de la presión en la AP que induciría mayor producción de NO con vasodilatación y disminución de la presión pulmonar [47]. Además en HIA, como se pudo estudiar en nuestro laboratorio [50], la función cardíaca fue más eficiente (fracción de eyección % sistólica aumentada), condición que no se mantuvo en las ratas expuestas a HIC, quienes presentaron menor función cardíaca y evidencias de remodelamiento del VD respecto a HIA. Creemos que esta condición conduce a hipertensión pulmonar, incremento de la presión capilar y subsecuente edema.

Efectos de la hipoxia hipobárica intermitente sobre antioxidantes enzimáticos.

Todos los órganos de los mamíferos requieren suficiente y constante suplemento de oxígeno como combustible para procesos biometabólicos, incluyendo la fosforilación oxidativa durante la respiración mitocondrial [51]. La limitada

disponibilidad de O₂ molecular genera la producción de especies reactivas de O₂ (ERO) y de nitrógeno (ERN) en los tejidos [56]. De esta manera, una sostenida exposición a hipoxia activaría la cascada de producción de ERO que podría sobrepasar la capacidad antioxidante endógena, produciéndose estrés oxidativo con inducción de daño en las biomoléculas, tales como la lipoperoxidación y la carbonilación proteica. El aumento de ERO inducirá también mecanismos antioxidantes de protección contra el daño oxidativo, dentro de los cuales se encuentran un aumento de expresión y actividad de SOD, CAT y GSH-Px, tanto en grupo HIA como HIC [52]. Un estudio previo, en nuestro mismo modelo animal, determinó que 4 ciclos de hipoxia hipobárica (equivalente a HIA en nuestro estudio), aumenta significativamente la capacidad antioxidante, mejorando la función cardíaca [7]. Sin embargo, dicho estudio no midió efectos sobre el territorio pulmonar. No obstante, otros autores han expuesto a hipobaría sostenida a ratas (5500 msnm simulados por 5 días), en quienes se encontró menor actividad y expresión de Mn-SOD y mayor de CAT en tejido pulmonar y cardíaco junto a niveles altos marcadores de estrés oxidativo [53]. A la luz de nuestros resultados, no hubo efectos en la expresión enzimática AO en los grupos estudiados, pero si obtuvimos diferencias en la actividad de algunas enzimas AO. Por ejemplo, la actividad CAT fue mayor en HIA y menor en HIC, en contraste la actividad de GSH-Px fue menor en HIA. En este sentido, estudios previos han advertido que CAT mejora su actividad frente a concentraciones altas de H₂O₂; por el contrario, GSH-Px se induce con menores concentraciones de este peróxido [54]. Para ello, este tipo de respuesta requiere GSH como donante de electrones (e⁻), el cual se oxida y se transforma en GSSG, y luego se reduce a GSH por medio de la enzima GSH reductasa que utiliza NADPH como donante de e⁻ [21]. El glutatión se forma en el citoplasma por acción secuencial de glutamato-cisteína ligasa y glutatión sintetasa, alcanzando altas concentraciones en citoplasma (1-11 mM), núcleo (3-15 mM) y mitocondrias (5-15 mM) [55]. Uno de sus componentes, la cisteína, requiere transporte activo para atravesar membranas, lo que explicaría la reducción de la síntesis de glutatión producto de inhibición del transporte por hipoxia, causada, en parte, por la baja captación de cisteína del espacio extracelular y consecuente

reducción de sus niveles intracelulares. Otra vía corriente arriba de reducción de glutatión, corresponde a la enzima gama glutamil transpeptidasa (γ GT) cuya función es regular los niveles GSH en el pulmón. La excesiva producción de ERO debido a elementos pro-inflamatorios (IL-1, 6, otras) [56], así como elementos pro-oxidantes como el H_2O_2 depletan el GSH en las diversas estructuras celulares, llevándolo a condición oxidado (GSSG). Esto perfectamente pudiese ocurrir secundario a hipoxia hipobárica intermitente aguda, en que ocurre disminución de expresión y actividad de las enzimas que presentan este tripéptido en su estructura, como por ejemplo: GSH-Px, GR, γ GT, entre otras. La reducción de esta última, reduce los niveles extracelulares de GSH, derivando en escasa síntesis intracelular de éste. Eso se expresó en nuestra experiencia, pues hubo reducción de GSH, aumento de GSSG y disminución de la actividad de GSH-Px en HIA [56, 57]. En HIC se equilibró la actividad de GSH-Px, así como los niveles de GSH en los tejidos. Este hecho se explicaría debido a que el incremento mantenido de ERO podría inducir nuevamente γ GT, normalizando los niveles de GSSG/GSH, GSH y GSH-Px.

En definitiva, HIA indujo mayor actividad de catalasa y provocó una reducción de GSH-Px. Por otra parte, en HIC hubo disminución de la actividad de catalasa. En ambos casos, el sistema antioxidante fue superado, dado evidencias de daño oxidativo y remodelación vascular.

Efectos de la hipoxia hipobárica intermitente sobre HIF y el balance Redox.

El factor inducido por hipoxia ha sido identificado como un mediador clave de la adaptación a hipoxia. En este estudio se esperaba que HIF-1 α aumentara su expresión y así se indujeran genes esenciales para la angiogénesis y remodelamiento de la vasculatura pulmonar [58]. Nuestros resultados fueron similares a los controles en ambas experiencias (HIA e HIC). Evidentemente, no eran los resultados esperados, dado que ese factor transcripcional se eleva en hipobaría, HIF 1 en aguda y HIF 2 en crónica [15]. Creemos que, en parte, se debió a que las ratas fueron expuestas a normobaría por un periodo no inferior a 60' previo

a su eutanasia, una vez retiradas de la cámara hipobárica, tiempo suficiente para degradar todo HIF 1 y 2 del nivel citosólico [15]. Esto debiese tenerse en cuenta para futuras investigaciones, donde una propuesta sería introducir a la rata en una cámara de procedimientos cuyo ambiente pueda modificarse, especialmente la FiO_2 , llevándola durante todo este periodo a una PiO_2 equivalente a la alcanzada por los animales en la cámara hipobárica (CH). De esta manera, la eutanasia podría realizarse en hipoxia ambiental, condición similar a la que existe en el interior de la cámara hipobárica.

A la vez, futuros estudios del Laboratorio podrían enfocarse en la determinación de la expresión de genes blancos de HIF, de tal manera de confirmar o descartar el aumento de la actividad transcripcional de HIF y así comprobar el comportamiento de este factor durante hipobaria, el cual se degrada rápidamente al retirar los animales de la cámara.

La hipoxia no es el único mecanismo que incrementa los niveles de HIF-1 α . En condiciones de normoxia, muchas citoquinas factores de crecimiento activadores de receptores del tipo tirosina quinasa también son capaces de inducir HIF-1 α , repercutiendo sobre un incremento en los niveles de este factor transcripcional. Entre éstos se incluyen: insulina, factor de crecimiento similar a la insulina 2, interleuquina-1b, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) [59]. De esta manera general, el mecanismo por el cual todos ellos inducen HIF-1 α incluye un incremento en la síntesis de la proteína, a diferencia de lo que ocurre en hipoxia, en la que la estabilidad del factor está asociada a una disminución de la tasa de degradación. En el caso de las ERO, puede existir un efecto directo sobre la estabilidad del factor VHL (von Hippel Lindau) y su unión a los sitios hidroxilados de HIF-1 y, además, la unión de HIF-1 a proteínas de estrés (HSPs) y sus eventuales modificaciones oxidativas postraduccionales, debido a que esta unión protege a HIF-1 de la degradación [59].

Nosotros encontramos un aumento de los niveles de TBARS en ambos grupos de ratas expuestas a HHI, respecto a sus controles, coincidiendo con estudios previos en que elevados niveles de este biomarcador representan el producto de

lipoperoxidación por daño oxidativo [60]. Además, aumentó marcadamente la relación GSSG / GSH en HIA. GSH juega un papel importante en señalización, desintoxicación de ERO, metales pesados y xenobióticos. Un aumento del estrés oxidativo puede depletar el GSH ya que utiliza su poder reductor, generando GSSG, lo que aumenta la relación GSSG/GSH [61]. Además, podría ocurrir una baja actividad de enzimas AO relacionadas (GPx, G Red), por lo que aumenta GSSG previo al paso enzimático [62].

Efecto de la hipoxia hipobárica intermitente sobre la morfoestructura de arterias pulmonares.

La circulación pulmonar es la única vasculatura requerida para contener el débito cardiaco completo, aún así, la presión de la arteria pulmonar es 8-10 veces menor a la circulación sistémica. También su respuesta a hipoxia es única, pues la falta de oxígeno induce una contracción rápida y reversible (63). Por el contrario, la circulación sistémica se dilata con el fin de incrementar la entrega de oxígeno frente a las demandas metabólicas de los tejidos (63). Frente a hipoxia crónica en cámara hipobárica ($PiO_2 = 10\%$) a los 28 días, un estudio mostró remodelamiento vascular caracterizado por proliferación de CML, engrosamiento de la íntima y extensión de músculo liso a arteriolas no musculares [64]. En nuestro estudio, los cambios encontrados en la estructura vascular en respuesta a hipoxia hipobárica intermitente fueron similares, pero más atenuados que los precedentes. Esto ocurrió en ambos modelos de ratas expuestas a HHI, los que además presentaron hipertrofia ventricular derecha [50, 66]. Este aumento del espesor del ventrículo derecho es un indicador de hipertensión pulmonar crónica. En nuestra investigación histomorfológica, las arterias pequeñas en HIA arrojaron diferencias sólo en regiones craneales y dorsales las cuales incrementaron grosores de capa media y pared total. A estos cambios se agrega un menor diámetro luminal en relación a controles. La hiperplasia de las CMLs determina un elevado tono vascular, incrementa la resistencia vascular con un efecto de aumento de poscarga, lo que deriva en hipertrofia del ventrículo cardiaco derecho [67]. Las arterias medianas de

las ratas HIA fueron afectadas en todos sus componentes, desarrollando remodelación y leve disminución del diámetro luminal. Esto es consistente con varios artículos relacionados con hipoxia hipobárica crónica, donde se ha descrito remodelación de los vasos pulmonares pequeños [1, 68]. Además, Yu y cols. [56], demostraron que HIF-1 tiene un papel fundamental en la respuesta pulmonar a hipoxia crónica, sus resultados mostraron el desarrollo de hipertrofia del VD y remodelación vascular pulmonar tardío en ratas HIF1 α ^{+/-} comparado con ratas HIF1 α ^{+/+}, donde se expresó claramente. Sin embargo, en nuestro estudio no pudimos demostrar un aumento de HIF, a pesar de importantes cambios en el fenotipo de los componentes vasculares, lo que podría deberse al carácter intermitente del estímulo hipóxico. Un remodelamiento vascular pulmonar del tipo que observamos se asocia a hipertensión pulmonar que podría derivar en algún grado de edema pulmonar [1]. Esto último es consistente con el aumento del peso húmedo pulmonar encontrado en las ratas HIC, como se comentó previamente. En las arterias pulmonares pequeñas de ratas HIA se produjo el efecto esperado, aunque de cuantía leve, con incremento del grosor de las paredes, acompañado de disminución del diámetro luminal. Esto se asoció claramente con el deterioro funcional y la remodelación estructural de la cavidad cardiaca derecha [66]. Por otro lado, en arterias pequeñas HIC no hubo remodelación de componentes vasculares en relación a controles crónicos. *A priori* uno podría pensar que estas arterias están en regresión de la condición descrita en ratas HIA. Sin embargo, otra explicación es que el grupo control también haya engrosado sus arterias pequeñas debido al proceso natural de envejecimiento [69]. Esto es más factible considerando que en el grupo HIC, las arterias medianas y grandes presentaron remodelación en capas media, adventicia y menor diámetro luminal en las ratas expuestas con respecto a controles. Estos hallazgos son similares a los encontrados en hipoxia crónica [70], en que cambia la dinámica del flujo sanguíneo debido al aumento de la rigidez de la pared vascular que incrementó en ellas la impedancia y el trabajo del VD en, al menos en un 40%. Subsecuentemente, la pérdida de flujo pulsátil redujo el *shear stress*, señal fundamental para inducir la activación de eNOS y, con ello, la

producción de NO. Recientemente, un estudio de un modelo de hipobaría intermitente aguda determinó que arterias de 4ª generación dan cuenta del incremento de grosores muscular y túnica adventicia, sin compromiso luminal, pero con hipertrofia del ventrículo derecho [71]. La disfunción de la fracción de eyección cardiaca encontrada por Aguilar [50] en las ratas utilizadas en esta tesis (no publicada), pudiese estar determinado por un efecto estructural sobre el ventrículo derecho. De esta forma, el aumento persistente de la resistencia llevaría a remodelación concéntrica, con disminución progresiva de los diámetros de las cavidades.

Ratas de laboratorio y su relación de edad con humanos

La exposición de animales de laboratorio a experiencias similares a las de humanos son muy frecuentes en laboratorios de investigación científica y elementos claves para el avance del conocimiento científico en biomedicina. Por este motivo, se presenta la tabla 5 que expresa la duración equivalentes de periodos de vida de humanos y ratas de laboratorio [72]. En nuestro modelo de ratas machos adultos, un ciclo de H/N 4x4, para la rata significaron un equivalente a 139,2 días humanos (4,6 m) expuestos a cámara hipobárica (hipoxia hipobárica) e igual tiempo fuera de ella, ya que un día de un hombre adulto equivale a 34, 8 días en una rata. Por lo tanto, cada ciclo fue equivalente a > 9 meses de vida humana. Esta experiencia se asemejaría a trabajadores de líneas férreas en Los Himalayas, quienes laboraban 6 meses en altitud y bajaban cerca del nivel del mar a descansar por igual tiempo. A pesar de que se aleja de los mineros chilenos cuyos turnos son 3, 4, 7 y hasta 30 días en hipobaría e igual tiempo en normobaría, existe la dificultad de exponer por día y los ritmos circadianos asociadas, donde se estima que 4 días en altura incluyen exposición durante el día y la noche (vigilia/sueño). El equivalente del trabajador minero 4x4, en una ratas sería 3x3 horas, lo cual no permitía esta exposición que incorpora 3-4 ciclos circadianos. Por esta razón se decidió exponerlas 4 días continuos y relacionar solo la edad de las ratas con las de los

humanos [72]. En definitiva, las exposiciones aguda (4 ciclos, 32d) y crónica (12 ciclos, 96d) de esta Tesis corresponderían a aproximadamente 3 y 9 años humanos.

| PERIODO | Tiempo de periodo en ratas (d) | Tiempo de periodo en humanos (d) | 1 año humano /Tiempo de ratas (d) | 1 día humanos / Tiempo en ratas (d) |
|----------------|---------------------------------------|---|--|--|
| LACTANCIA | 21 | 180 | 42,4 | 8,6 |
| PUBERTAD | 38 | 4198 | 3,3 | 110,5 |
| ADULTEZ | 210 | 7300 | 10,5 | 34,8 |
| SENESENCIA | 600 | 18615 | 11,8 | 31 |
| POSTSENESENCIA | 486 | 10585 | 17,1 | 21,4 |

Tabla 5: **Ratas de laboratorio y su relación de edad con humanos**, datos obtenidos de Sengupta P, *Int J Prev Med* 2013; 4: 624-630 [72].

CONCLUSIONES

Las respuestas fisiopatológicas estudiadas fueron determinadas por la extensión de la exposición a HHI.

HIA. Los resultados obtenidos rechazan la hipótesis planteada, pues no se incrementó la expresión de enzimas AO. Por otra parte, hubo aumento de estrés oxidativo y remodelamiento vascular.

HIC. Los resultados rechazan la hipótesis planteada, debido a que no hubo incremento de expresión de enzimas AO, aunque si hubo aumento EO y de remodelamiento vascular, interesantemente estos fueron más bajos a los esperados y, comparativamente, menores a HIA.

La hipoxia hipobárica intermitente produjo cambios fisiopatológicos a nivel pulmonar, celular y de expresión proteica, con alteración del tono oxidativo. Este hecho se pudo evidenciar por remodelamiento vascular pulmonar que fue más atenuado en hipobaría intermitente que en hipoxia crónica.

Este modelo demostró ser útil para el estudio de los efectos pulmonares de HHI, con el cual se pueden realizar estudios invasivos y de expresión molecular que no podrían realizarse en seres humanos. Además, se estima que aun puede mejorarse con refinamiento de técnicas de los procedimientos para obtener las muestras. A la vez, la introducción de técnicas funcionales podría aportar al conocimiento de la función pulmonar y respiratoria en altura.

RELEVANCIA Y PERSPECTIVAS

Este trabajo investigó los efectos de la hipobaría intermitente aguda (HIA) y crónica (HIC) en el tejido pulmonar respecto a estrés oxidativo, la expresión y actividad de enzimas AO, HIF 1 y 2, y las características histomorfológicas de los vasos pulmonares.

Este estudio es un aporte en el descubrimiento de mecanismos que participan en la respuesta cardiopulmonar en HHI, fenómeno aun poco estudiado.

La exposición a HI no es inocua y se deben continuar los estudios para determinar otros biomarcadores de interés y, posteriormente definir probables intervenciones terapéuticas para minimizar los efectos perjudiciales sobre el sistema cardiopulmonar, algunos de ellos demostrados en este estudio.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio que simuló estadía en turnos hipobaría/normobaría 4x4, podríamos predecir que los trabajadores podrían presentar compromiso pulmonar, subclínico inicialmente y luego clínico, que va a estar en relación directa con la altitud y tiempo de exposición.

A priori, una primera intervención podría estar dirigido a hábitos de vida. Por ejemplo, se podría recomendar una alimentación sana, con alto contenido de antioxidantes, o incluso suplementos farmacológicos con antioxidantes.

Mientras más acabado sea el conocimiento acerca de los efectos de la HHI en el pulmón, mayor será la posibilidad de llegar a acertar en una propuesta de tratamiento efectivo para los miles de trabajadores expuestos a estos turnos en altitud.

PRODUCTIVIDAD CIENTÍFICA DE LA TESIS

Resúmenes en Congresos científicos:

1. Aguilar M, González-Candia A, **Rodríguez J**, Castillo RL, Herrera EA. Intermittent hypobaric hypoxia: acute and chronic effects on cardiovascular function, structure and oxidative stress. Atacama-Leh Meeting, Coping with hypoxia at high altitude: How lung, blood and brain respond and crosstalk. San Pedro de Atacama, Chile. Marzo 4-9, 2018.

2. **Rodríguez J**, Castillo RL, Herrera EA. Marcadores de estrés oxidativo, capacidad antioxidante y estructura pulmonar en ratas expuestas a hipoxia intermitente. II Feria de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Septiembre 2017.

3. Aguilar M, González-Candia A, **Rodríguez J**, Castillo R, Herrera EA. Chronic intermittent hypobaric hypoxia have differential effects on carotid and femoral vascular function. II Meeting on Research and Innovation in Vascular Health & IV Research Meeting on Hypertension in Pregnancy, Chillan, Chile, 6-8 Julio 2017. *Best poster award*

Manuscrito en Revista ISI:

Aguilar M, González-Candia A, **Rodríguez J**, Carrasco-Pozo C, Cañas D, García C, Herrera EA, Castillo RL. Mechanisms of Cardiovascular Protection Associated with Intermittent Hypobaric Hypoxia Exposure in a rat model: Role of Oxidative Stress. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018; 19 (288): 1-15.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Peñaloza D. Efectos de la exposición a grandes alturas en la circulación pulmonar. *Rev Esp Cardiol.* 2012; 65 (12):1075-8.
2. Farías JG, Jiménez D, Osorio J, Zepeda AB, Figueroa CA, Pulgar VM. Acclimatization to chronic intermittent hypoxia in mine workers: a challenge to mountain medicine in Chile. *Biol Res.* 2013, 46: 59-67.
3. Norma técnica N° 57 MINSAL. Exposición ocupacional a hipobaría intermitente crónica por gran altitud. Dpto de Salud Ocupacional, Ministerio de Salud, Chile, 2013.
4. Swenson ER. Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction. *High Alt Med Biol.* 2013; 14: 101-110.
5. Scherrer U, Allemann Y, Rexhaj E, Rimoldi S, Sartori C. Mechanisms and drug therapy of pulmonary hypertension at high altitude. *High Alt Med Biol.* 2013; 14: 126-133.
6. Castillo RL, Farías JG, Herrera EA, Álvarez PI, Short SE, Tapia L, Carrasco R, Sotomayor R. Effects of Chronic Intermittent Hypoxia and Polyunsaturated Fatty Acids on Infarct Size and Oxidative Stress Markers in Cardiac Ischemia Reperfusion. *Exp Clin Cardiol.* 2014; 20: 3833-58.
7. Herrera EA, Farías JG, González A, Short S, Carrasco C, Castillo RL. Ω 3 Supplementation and Intermittent Hypobaric Hypoxia Induce Cardioprotection Enhancing Antioxidant Mechanisms in Adult Rats. *Mar Drugs.* 2015; 13: 838- 60.
8. Herrera EA, Verkerk MM, Derks JB, Giussani DA. Antioxidant treatment alters peripheral vascular dysfunction induced by postnatal glucocorticoid therapy in rats. *PLoS ONE.* 2010; 5: 1-8.
9. West JB, Schoene R, Milledge J. En: *High Altitude Medicine and Physiology.* Holder Arnold Ed. Ed. 5ª. 2013; Pags. 40-41,.
10. Yu AY, Frid MG, Shimoda LA, Wiener CM, Stenmark K, Semenza GL. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible

- factor 1 in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1998; 275: L818-L826.
11. Liao WT, Liu B. Metabolite modulation in human plasma in the early phase of acclimatization to hypobaric hypoxia. *Sci Rep.* 2016; 6: 1-14.
 12. Iturriaga R, Moya EA, Del Rio R. Inflammation and oxidative stress during intermittent hypoxia: the impact on chemoreception. *Exp. Physiol.* 2015; 100: 149–155.
 13. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol.* 2007; 78: 183-205
 14. Richard N, Koehle M. Differences in cardio-ventilatory responses to hypobaric and normobaric hypoxia: A review. *Aviat Space Environ Med.* 2012; 83: 677-684.
 15. Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology.* 2009; 24:97–10.
 16. Shimoda L, Semenza GL. HIF and Lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011; 183: 152-6.
 17. Patel S, Simon C. Biology of hypoxia-inducible factor-2 α in development and disease. *Cell Death Differ.* 2008; 15: 628-635.
 18. Farías JG, Herrera EA, Carrasco-Pozo C, Sotomayor-Zárate R, Cruz G, Morales P, Castillo RL. Pharmacological models and approaches for pathophysiological conditions associated with hypoxia and oxidative stress. *Pharmacol Ther.* 2016; 158: 1–23.
 19. Bailey D, Dehnert C, Luks A, Menold E, Castell C, Schendler G, Faoro V, Gutowski M, Evans K, Taudorf S, James P, McEneny J, Young E, Mairbaurl H, Bartsch P, Beger M. High-altitude pulmonary hypertension is associated with a free radical-mediated reduction in pulmonary nitric oxide bioavailability. *J Physiol.* 2010; 588: 4837-47.
 20. Zhou W, Li S. Effects of various degrees of oxidative stress by intermittent hypoxia in rat myocardial tissues. *Respirology.* 2012; 17: 821-30.

21. Valko M, Leifbritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39:44-84
22. Andresen M, Regueira T, Leighton F. Estrés oxidativo en el paciente crítico. *Rev Méd Chile.* 2006; 134: 649-656.
23. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015; 4: 180–183.
24. Ribon A, Pialoux V, Saugy JJ, Rupp T, Faiss R, Millet GP. Exposure to hypobaric hypoxia results in higher oxidative stress compared to normobaric hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol.* 2016; 223: 23-7.
25. Silvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP. Hypoxic Pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev.* 2012; 92 (1): 367-520.
26. Araneda O, Tuesta M. Lung oxidative damage by hypoxia. *Oxid Med Cell Longev.* 2012; 85:1-18.
27. Rivera R. Histopatología y fisiopatogenia de la hipertensión pulmonar. *Rev Inst Nac Enf Resp Mex.* 2004; 1: 17-27.
28. Hassoum PM, Mouthon L, Barbera JA, Eddahibi S, Flores S, Grimminger F, Lloyd Jones P, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX, Humbert M. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 54: S10-S19.
29. Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 43: 629-634.
30. Olivares R, Gil J. Lobulación pulmonary de la rata blanca (*Rattus norvegicus albinus*). *Int J Morphol.* 2016; 34:901-903.
31. Torres F, González-Candia A, Montt C, Ebensperger G, Chubretovic M, Serón-Ferré M, Reyes RV, Llanos AJ, Herrera EA. Melatonin reduces oxidative stress and improves vascular function in pulmonary hypertensive newborn sheep. *J Pineal Res.* 2015; 58: 362-37.

32. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
33. Ku H, Lim H, Oh K, Yang H, Jeong J, Kim S. Interpretation of protein quantitation using the Bradford assay: Comparison with two calculation models. *Anal Biochem.* 2013; 434:178-80.
34. Superoxide Dismutase Assay Kit. www.caymanchem.com
35. Catalase Assay Kit. www.caymanchem.com
36. Glutathione Peroxidase Assay Kit. www.caymanchem.com
37. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 1976; 74: 214-226.
38. Janero DR. Malondialdehyde and Thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad Biol Med.* 1990; 9: 515-540.
39. Percival K, Radi Z. A modified Verhoeff-van Gieson elastin histochemical stain to enable pulmonary arterial hypertension model characterization. *Eur J Hist.* 2016; 60: 2588.
40. West, J; Mario A, West JB. Fisiología Respiratoria. Ed. Wolters Kluwer. 2009. N° 612.215.
41. Astorga CR, González-Candia A, Candia AA, Figueroa EG, Cañas D, Ebersperger G, Reyes RV, Llanos AJ, Herrera EA. Melatonin decreases pulmonary vascular remodeling and oxygen sensitivity in pulmonary hypertensive newborn lambs. *Front Physiol.* 2018; 9: 185. Doi 103389/physol 2018.00185. eCollection. 2018.
42. Palmer B, Clegg D. Ascent to altitude as a weight loss method: The good and bad of hypoxia inducible factor activation. *Obesity.* 2014; 22: 311-317.
43. Ambrosini G, Nath AK, Honigmann MR, Riveros J. Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 2002; 277: 34601-34609.

44. Zhang H, Zhang G, González F, Park S, Cai D. Hypoxia-inducible factor directs POMC gene to mediate hypothalamic glucose sensing and energy balance regulation. *PLoS Biol.* 2011; 9: 1-16.
45. Simler N, Malgouy A, Koulmann N, Alonso A, Peinnequin A, Bigard AX. Hypoxic stimulus alters hypothalamic AMP-activated protein kinase phosphorylation concomitant to hypophagia. *J Appl Physiol.* 2007; 102: 2135-41.
46. Renna N, de las Heras N, Miatello R. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. *Int J Hypert.* 2013. DOI: 101155/2013/808353.
47. Chen J, Wang YX, Dong MQ, Zhang B, Luo Y, Niu E, Li Z. Reoxygenation reverses hypoxic pulmonary arterial remodeling by inducing smooth muscle cell apoptosis via reactive oxygen species-mediated mitochondrial dysfunction. *J Am Heart Assoc.* 2017; 6:e005602.
48. Takimoto E, Kass D. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertensive.* 2007; 49: 241-248.
49. Sarada S, Himadri P, Misha C, Geetali P, Ram S, Ilavazhagan. Role of oxidative stress and NF κ B in hypoxia-induced pulmonary edema. *Exp Biol Med.* 2008; 233: 1088-1098.
50. Aguilar M. Hipoxia hipobárica intermitente: efectos agudos y crónicos en la función, estructura y estrés oxidativo cardiovascular. Tesis para optar al grado de Magister en Fisiopatología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, 2018.
51. Tabima D, Frizzell S, Gladwin M. Reactive oxygen and nitrogen species in pulmonary hypertension. *Free Radic Biol Med.* 2012; 52:1-41.
52. Miyata T, Takizawa S, va Ypersele Ch. Intracellular sensors for oxygen and oxidative stress: novel therapeutic targets. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2011; 300: 226-31.
53. Veit F, Pak O, Brandes R, Weissmann N. Hypoxia-dependent oxygen species signaling in the pulmonary circulation: focus on ion channels. *Antioxid Redox Signal.* 2015; 22: 537-553.

54. Nakanishi K, Tajima F, Nakamura A, Yagura S, Ookawara T, Yamashita H, Suzuki K, Taniguchi N, Ohno H. Effects of hypobaric Hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *J Physiol.* 1995; 489: 869-876.
55. Martínez M, Barrado D, Zubillaga M, Hager A, De Paoli T, Boccio J. Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis. *Acta Bioquim Clin Latinoam.* 2006; 40:45-51.
56. Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, Huso DL, Sun X, McWilliams R, Beaty T, Sham JS, Wiener CM, Silvester JT, Semenza GL. Impaired Physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 alpha. *J Clin Invest.* 1999; 103: 691-696.
57. Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur Respir J.* 2000; 16: 534-554.
58. Haase VW. "Pathophysiological consequences of HIF activation: HIF as a modulator of fibrosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1177: 57-65.
59. Zepeda AB, Pessoa A Jr, Castillo RL, Figueroa CA, Pulgar VW, Farías JG. Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. *Cell Biochem Funct.* 2013; 31: 451-9.
60. Altan M, Atukeren P, Mengi M, Metin G, Cakan L, Gumustas K. Influence of intermittent hypobaric exposure on SOD and TBARS levels in trained rats. *Chin J Physiol.* 2009; 52: 106-112.
61. Jones D, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn M, Stenberg P. Redox state of glutathione in human plasma. *Free Rad Biol Med.* 2000; 28: 625-35.
62. Sitka O, Skalickova S, Gumelec J, Masarik M, Adam V, Hubalek J, Trnkova L, Kruseova J, Eckschlager T, Kizek R. Redox status expressed as GSH: GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumor patients. *Oncol Lett.* 2012; 4: 1247- 1253.
63. Sommer N, Dietrich A, Schermuly, Ghofrani H, Gudermann T, Schulz R, Seeger W, Grimminger F, Weissmann. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur Respir J.* 2008; 32: 1639-1651.

64. Zhao S, Xue X, Gao P, Deng H, Yao X, Zhang J, Gao N, Cui L, Wang Y, Pan L, Yang S. A rat model of sustained hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Int J Clin Exp Med*. 2017; 10: 3366-3372.
65. Hill N, Woods D. Energy at high altitude. *J Army Med Corps*. 2011; 157:43-48.
66. Aguilar M, González-Candia A, Rodríguez J, Carrasco Pozo C, Cañas D, García C, Herrera EA, Castillo RL. Mechanisms of cardiovascular protection associated with intermittent hypobaric hypoxia exposure in a rat model: role of oxidative stress. *IJMS*. 2018; 19: 1-15.
67. Rabinovich M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest*. 2008; 118: 2372-79.
68. Tanaka Y, Shuster D, Davis E, Patterson A, Botney M. The role of vascular injury and hemodynamics in rat pulmonary artery remodeling. *J Clin Invest*. 1996; 98: 434-442.
69. Huez S, Brimiouille S, Naeije R, Vachiery JL. Feasibility of routine pulmonary arterial impedance measurements in pulmonary hypertension. *Chest*. 2004; 125: 1221-2128.
70. Brito J, Siques P, Arribas S, López de Pablo A, González M, Naveas N, Arriaza K, Flores K, León-Velarde F, Pulido R, Ordenes S, López M. Adventitial alterations are the main features in pulmonary artery remodeling due to long-term chronic intermittent hypobaric hypoxia in rats. *Bio Med Res Intern*. 2015: 169841.
71. Stenmark K, Fagan K, Frid M. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ. Res*. 2006; 99:675-691.
72. Sengupta P. The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med*. 2013; 4: 624-630.