

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



**HIPOXIA HIPOBÁRICA INTERMITENTE: EFECTOS
AGUDOS Y CRÓNICOS EN LA FUNCIÓN,
ESTRUCTURA Y ESTRÉS OXIDATIVO
CARDIOVASCULAR**

MIGUEL AGUILAR GONZALEZ

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN FISIOPATOLOGÍA

Director de Tesis: Prof. Dr. Emilio A. Herrera V.

Co- Director de Tesis: Prof. Dr. Rodrigo Castillo P.

2018

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

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

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

MIGUEL AGUILAR GONZALEZ

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Fisiopatología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día xx de marzo de 2018

Prof. Dr.....

Director de Tesis

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Prof. Dr.

Presidente Comisión

Indice

Agradecimientos	4
Abreviaturas	5-6
Abstract	7-8
Resumen	9-10
Conceptos Generales	11
Efectos sistémicos y cardiovasculares de hipoxia aguda	11-12
Efectos celulares de la Hipoxia	12-13
Efectos sistémicos de hipoxia crónica	13-14
Endotelio y vasodilatación dependiente de NO	14-15
Otras formas de vasodilatación dependientes del endotelio	15
Estrés oxidativo	15-16
Hipótesis	17
Objetivo General	17
Materiales y Métodos	18
• Modelo de estudio	18
• Función y morfología cardiaca	18-19
• Función vascular	19
• Marcadores de hipoxia y estrés oxidativo	20
• Enzimas antioxidantes	20
• Marcadores de estrés oxidativo	20
• Fuentes de ERO	20
• Histología cardiovascular	21
• Análisis estadístico	21
Resultados	22
• Función Cardiaca HIA	22-23
• Función Cardiaca HIC	23-24
• Función vascular HIA	24-28
• Función vascular HIC	29-32
• Expresión de enzimas antioxidantes HIA	33
• Estrés oxidativo HIA	33
• Actividad enzimas antioxidantes HIA	34
• Expresión HIF 1 α -2 α HIA	34
• Expresión de enzimas antioxidantes HIC	35
• Estrés oxidativo HIC	35
• Actividad enzimas antioxidantes HIC	35
• Expresión HIF 1 α -2 α HIC	36
• Fuentes productoras de ERO HIA	36
• Fuentes productoras de ERO HIC	36
• Histología Cardiaca HIA	37-39
• Histología Vascular HIA	39-40
• Histología Cardiaca HIC	41-43
• Histología Vascular HIC	44-45
Discusión	46-53
Conclusión	54
Referencias	55-61
Anexos	62-64

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente, a mis tutores Dr. Emilio Herrera Videla y el Dr. Rodrigo Castillo Peñaloza, además de Dr(c) Alejandro González Candia, quienes me han mostrado el difícil mundo de la ciencia que tanto les apasiona. Agradecer los conocimientos entregados, motivación y por sobre todo la paciencia.

Han logrado que resulte más fácil lo que en pregrado resultaba imposible. Ha sido un privilegio contar con su guía y ayuda.

Además, agradecer a mis padres Carmen González Pérez y José Miguel Aguilar Donoso, sin ellos nada sería posible.

También Andrea Ordenes Araya y Matías Aguilar González, los que me impulsan y apoyan incondicionalmente en todos mis desafíos.

ABREVIATURAS

4HNE: 4 hidroxinonenal

5HT: Serotonina

A: Area

AL: Área luminal

AM: Área muscular

ATP: trifosfato de adenosina

AT: Área total

AUC: Área bajo la curva

BH4: Tetrahidrobiopterina.

Ca⁺: Calcio

cAMP: Adenosinmonofosfato cíclico

CAT: Catalasa

cGMP: Guanosín monofosfato cíclico.

COX: Ciclooxygenasa

CT: cardiaca total

cm: centímetros

°C: Grados Celsius

DVIS: Diámetro del ventrículo izquierdo en sístole

DVID: Diámetro del ventrículo izquierdo en diástole

DAI: diámetro de la aurícula izquierda

DA: diámetro aórtico

DAP: Diámetro Antero Posterior

DL: Diámetro Lateral

DI: Diámetro Luminal

DM: Diámetro Muscular externo

DT: Diámetro total vascular

EDHF: Factor Hiperpolarizante derivado del endotelio

EDRF: factores vasodilatadores provenientes del endotelio.

E_{max}: Vasoconstricción máxima

e_{NO}S: Sintasa de Óxido nítrico endotelial.

ERO: Especies reactivas del oxígeno.

ESM: Error estándar de la media.

FA: Fracción de acortamiento

FE: Fracción de eyección

FC: Frecuencia cardiaca

FiO₂: Fracción inspirada de oxígeno

GSH-Px: Glutación Peroxidasa

GS: Grosor Septum

GA: Grosor adventicia

GM: Grosor Muscular

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HIA: Grupo Hipoxia hipobárica intermitente de 4 ciclos (aguda)

HIC: Grupo Hipoxia hipobárica intermitente de 12 ciclos (crónico)

HIF: Factor inducible por hipoxia

HP: Hipertensión pulmonar

i_{NO}S: Sintasa de óxido nítrico inducible.

IP₃: Inositol trifostato.

K⁺: Potasio

L-NAME: N ω -Nitro-L-arginine methyl ester

IL: Interleuquina

L: Longitud

lpm: latidos por minuto

LVD: Area Luminal Ventrículo Derecho

Mcr: micrones

MetCh: Metacolina

Mits: Mitocondria

MLCP: Fosfatasa de cadena ligera de miosina

mm: milímetros

NA: Grupo control de 4 ciclos (agudo)

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato reducida

NC: Grupo control crónico

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintasa

NT: Nitrotirosina

NF-Kb: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

Nm: Nano mol

ONOO⁻: Peroxinitrito.

O₂: Oxígeno

•O₂⁻: Radical superóxido.

pD₂: -log EC₅₀

PGI₂: Prostaciclina.

PIP₃: Fosfoinositol trifosfato.

PKC: Proteína kinasa C.

PLVI pared libre del ventrículo izquierdo en

PLI: Pared Libre del Ventrículo Izquierdo

PLVD: Pared Libre del Ventrículo Derecho

PA: Perímetro adventicia

PM: Perímetro muscular

PL: Perímetro luminal

PKA: Proteína kinasa A

Rmax: Respuesta máxima a un agente vasoactivo

Rmax: Relajación máxima

sGC: Guanilato ciclasa soluble.

SNP: Nitroprusiato de Sodio

SNM: sobre el nivel del mar

SOD: Superóxido dismutasa

S+VI: Ventrículo izquierdo más septum

TNF-α: El factor de necrosis tumoral α

TGF-β1: factor de crecimiento transformante beta 1

TIVD: tabique interventricular en diástole

UA: Unidades Arbitrarias

VD: Ventrículo derecho

V: Volumen

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

WB: Western-Blot

XO: Xantino Oxidasa

Abstract

Hypoxia is the deficit of tissue oxygenation, which is generated when oxygen is not enough to satisfy metabolic demands. Hypobaria is defined as the decrease in barometric pressure that rises at high altitude, relative to sea level, starting at 2500 meters above sea level.

In Chile, workers of the high-altitude mines (> 2,500 m) experience this condition intermittently, and in a smaller population the workers of customs, border control, members of the army, tourist guides and mountaineers. Environmental hypoxia induces several responses in the organism, mainly at the pulmonary and cardiovascular level. Previous studies associates the exposure of 4-cycle Intermittent Hypobaric Hypoxia (IHH) with cardioprotective effects, such as a better recovery of the pressure developed by the left ventricle, a decrease in oxidative stress, and an increase antioxidant capacity of the heart. Other studies show an enhance function of the left ventricle and the prevention of cell death. These changes are associated with coronary vasodilation and myocardial angiogenesis. Furthermore, the prolongation of the hypoxic intermit-tence decreases heart rate, induces a dilatation of the right ventricle and enhances plasma triglycerides. However, few is known about the cardiovascular responses of the prolonged IHH. Given the above, and the impact it could have on the health of high-altitude workers in Chile and the world, the aim of this work is to describe in a rat model, the effects on cardiac and vascular function on different expositions - Acute and Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia. Adult Wistar rats (n = 24) were separated into 4 equal groups: 1) IHH of 4 cycles, acute (HIA), 2) IHH of 12 cycles, chronic (HIC) and, 3 and 4) their normobaric controls. IHH was induced in a hypobaric chamber every 4 days (1 cycle = 4 days of hypoxia x 4 days at normoxia) at an environmental pressure equivalent to 4,600 m of altitude (428 Torr). At the end of each cycle, cardiac functional and structural variables were determined through echocardiography (*in vivo*). Further, at the end of the IHH exposition (4 or 12 cycles), we obtained samples to assess vas-cular function by wire myography, and cardiac and vascular histological properties. In addition, we determined cardiac biochemical markers of the cellular response to hypoxia such as Hy-poxia inducible factors type 1 and 2 (HIF 1-2), markers of oxidative stress and antioxidant ca-pacity. Our findings revealed a higher ejection (EF%) and shortening fraction (SF%), improve vasodilatory capacity of the studied arteries and a greater expression of antioxidant enzymes in HIA, as compared with the respective controls. In addition, a remodeling of the right ventricle was found, without compromising the septum or the left ventricle while there was an increase

in the thickness of carotid muscular layer. In contrast, HIC presented a maintenance of cardiac function, increased oxidative stress and femoral vascular remodeling with decreased vasodilator capacity. These findings suggest that the cardiovascular responses to hypoxia are time dependent of IHH exposition, which can define different pharmacological targets according to the time of exposure to hypobaric hypoxia.

Resumen

La hipoxia es el déficit de la oxigenación en los tejidos, el cual se genera cuando el oxígeno suministrado no es suficiente para satisfacer las demandas metabólicas. Hipobaría se define como la disminución de la presión barométrica a medida que se asciende en altura, respecto del nivel del mar. Esta determina respuestas fisiológicas clínicamente evidentes a alturas superiores a los 2500 metros. En Chile la fuerza laboral de la minería en tierras altas (> 2.500 msnm) es la que experimenta esta condición de manera intermitente, y en una población menor los trabajadores de aduana, control fronterizo, miembros del ejército, guías de turismo y montañistas. La hipoxia ambiental genera diferentes respuestas adaptativas en el organismo principalmente a nivel pulmonar y cardiovascular. Estudios previos muestran efectos cardioprotectores en un modelo de Hipoxia Hipobárica Intermitente (HHI) de 4 ciclos tales como una mejor recuperación de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo, disminución de estrés oxidativo, y un aumento de la actividad antioxidante cardíaca. Además, esto mejora la función del ventrículo izquierdo y previene la muerte celular, asociada a vasodilatación coronaria y angiogénesis miocárdica, durante ciclos de hipobaría intermitente de corta duración. Pese a esto, se ha observado que la prolongación de esta intermitencia podría originar maladaptaciones, asociadas al aumento del estrés oxidativo, aumento persistente de la presión arterial sistémica, reducción de la frecuencia cardíaca, dilatación del ventrículo derecho, y aumento de triglicéridos plasmáticos. Sin embargo, poco se sabe acerca de los efectos cardiovasculares según el tiempo de exposición. Dado lo anterior, esta tesis tiene como objetivo describir en un modelo murino, los efectos en la función cardíaca y vascular de la exposición a Hipoxia Hipobárica Intermitente Aguda (HIA) y Crónica (HIC).

Para esto se utilizaron Ratas Wistar adultas (n=24) separadas en 4 grupos iguales: 1) HHI de 4 ciclos, aguda (HIA), 2) HHI de 12 ciclos, crónica (HIC) y, 3 y 4) sus controles normobáricos respectivos. La HHI fue inducida en una cámara hipobárica durante 4 días, cada 4 días (1 ciclo= 4 días de hipoxia x 4 días normoxia) a una presión ambiental equivalente a 4,600 mts de altitud (428 Torr). Al término de cada exposición se determinaron variables funcionales y estructurales cardíacas a través de parámetros ecocardiográficos (*in vivo*). Al término de la exposición (4 y 12 ciclos), se obtuvieron muestras para determinar función vascular por miografía de alambre, y la estructura vascular y cardíaca mediante histología. Se midieron además marcadores bioquímicos de la respuesta celular a hipoxia: factor inducible por hipoxia tipo 1 y 2 (HIF 1-2), biomarcadores de estrés oxidativo y capacidad antioxidante. Nuestros hallazgos destacan una mayor fracción de eyección (FE%) y fracción de acortamiento (FA%) cardíaco,

mejor capacidad vasodilatadora de las arterias estudiadas y una mayor expresión de enzimas antioxidantes en HIA, al ser comparado con los controles respectivos. Además, se encontró una remodelación del ventrículo derecho, sin compromiso del septum ni del ventrículo izquierdo mientras que a nivel vascular las carótidas generaron un aumento del espesor de la capa muscular. En contraste, HIC presentó una mantención de la función cardíaca, mayor estrés oxidativo y remodelamiento vascular femoral con disminución de la capacidad vasodilatadora. Estos hallazgos sugieren que la respuesta cardiovascular a HHI es dependiente del tiempo de exposición, con lo cual se podrán definir distintos blancos farmacológicos según el tiempo de exposición a hipoxia hipobárica.

1. INTRODUCCION

1.1. Conceptos generales

La hipoxia es el déficit de la oxigenación en los tejidos, el cual se genera cuando el oxígeno suministrado no es suficiente para satisfacer las demandas metabólicas (1). Hipobaría se define como la disminución de la presión barométrica respecto del nivel del mar. Esta tiende a hacerse clínicamente evidente, determinando respuestas fisiopatológicas a alturas superiores a los 2500 msnm. (2). La disminución de la presión barométrica conlleva una disminución en la presión inspirada de oxígeno, lo que genera una disminución de la concentración de oxígeno en la sangre, es decir hipoxemia, y que podría derivar finalmente en hipoxia. En Chile existen poblaciones humana de trabajadores que realizan sus labores en altura y descansan por un período equivalente en tierras bajas, patrón conocido como hipoxia hipobárica intermitente (HHI) (3). La hipoxia intermitente crónica (HIC), es considerada como la exposición humana a esta condición sobre los 6 meses, con intermitencia entre normoxia e hipoxia, en donde se mantenga al menos 30% del tiempo en hipoxia (4).

1.2. Efectos sistémicos y cardiovasculares de la hipoxia

En Chile la fuerza laboral de las minas de altura (> 2.500 snm) es la que experimenta esta condición, y en una población menor los trabajadores de aduana, control fronterizo, miembros del ejército, guías de turismo y montañistas (1). El ambiente hipóxico genera diferentes cambios fisiológicos en el organismo principalmente a nivel pulmonar y cardiovascular, compensando la disminución de la presión parcial de oxígeno. Por ejemplo, se induce un aumento del gasto cardiaco a través del aumento de la frecuencia cardiaca y del volumen sistólico (2). Además, se genera un aumento de la resistencia vascular periférica que determina una elevación de la presión arterial sistémica. Estas respuestas estarían en parte determinadas por un aumento del tono simpático que se encuentra acentuado debido a una mayor actividad aferente de los cuerpos carotídeos, secundario a un aumento en la ganancia de los quimiorreceptores, que se mantiene incluso en normoxia (5). Otros efectos secundarios a este aumento del tono simpático son: aumento de la liberación de aldosterona, aumento de reabsorción de sodio y mayor sensación de sed, generando un aumento de la volemia, y la pre y post-carga ventricular

(6,7). Estos mecanismos adaptativos se perpetúan por el estímulo en la transcripción de genes específicos en las células bajo hipoxia (8).

Múltiples estudios muestran que estos mecanismos de adaptación podrían generar protección fundamentalmente en el sistema cardiovascular, induciendo efectos similares al precondicionamiento por episodios de isquemia, el cual se define como la reducción del tamaño de infarto si se aplican períodos cortos de isquemia, previos a un episodio isquémico de mayor duración (ej. oclusión total de una arteria coronaria), en ausencia de desarrollo de circulación colateral (9). El pre-condicionamiento se fundamenta en las respuestas defensivas del organismo a determinadas noxas, por lo que, si se aplica un estímulo nocivo por debajo del umbral de daño, aumenta la resistencia de este tejido a dicha noxa (10). Estudios realizados por Beguin y cols (2005), compararon el efecto de una isquemia aguda en ratas, sometidas a hipoxia intermitente moderada (fracción de oxígeno inspirado, $FiO_2 = 10\%$, aplicada durante 4 horas), obteniendo como resultado un menor tamaño de infarto en las ratas con hipoxia, en comparación con los controles normóxicos (11, 12).

La mayoría de los estudios asociados al efecto de precondicionamiento hipóxico describen exposiciones agudas, las cuales desencadenan una respuesta defensiva que duraría desde horas hasta algunos días. Sin embargo, se ha observado que la hipoxia hipobárica intermitente de 4-6 semanas o menos, puede generar un periodo de protección mucho mayor que el obtenido en exposiciones más prolongadas (13, 14). Por ejemplo, estudios de Castillo y cols (15); y Herrera y cols (16), muestran efectos cardíacos adaptativos de la HHI de 4 ciclos, tales como reducción del daño del infarto miocárdico, una mejor recuperación de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo, disminución de marcadores de estrés oxidativo, y un aumento de la actividad antioxidante cardíaca.

1.3. Efectos celulares de la hipoxia

El efecto hipóxico en la célula desencadena cambios en la expresión génica, los que están determinados en parte por los factores de transcripción, en este caso el factor inducible por hipoxia (HIF), de los cuales se han descrito 3 subtipos HIF1, HIF2 y HIF3 (17). Estos factores están constituidos por dos subunidades alfa y beta, la subunidad beta se encuentra en el núcleo y para estimular la transcripción necesita unirse a la sub-unidad alfa, la que se encuentra

en el citosol. En una célula con niveles apropiados de oxígeno (normoxia), se encuentra inhibida la capacidad transcripcional del HIF mediante la hidroxilación de la prolina de la sub unidad alfa, permitiendo su unión a la ubiquitina, llevándola al proteosoma donde es degradada. En ausencia de oxígeno esta degradación no es llevada a cabo y logra migrar al núcleo uniéndose con la sub unidad beta, estimulando de esta manera la transcripción de genes defensivos activados por hipoxia (14,18). Aparentemente HIF 1-2, son los principales factores en la adaptación al estímulo hipóxico. Pese a que ambas formas son estructuralmente similares, existen diferencias entre ellas, particularmente en cuanto a su regulación de acuerdo a la duración del periodo de hipoxia. En efecto, HIF-1 es más activo ante periodos cortos de hipoxia y/o hipoxia intensa, mientras que HIF-2 se activa en condiciones de hipoxia leve o estados crónicos. Estos presentan estimulación de transcripciones comunes, como el factor de crecimiento endotelial (VEGF), aumento de enzimas antioxidantes, óxido nítrico sintasa inducible, expresión de proteínas antiapoptóticas como bcl-2 y bcl-x, la expresión de canales de potasio dependientes de ATP y la proteína quinasa C (14,19). Con respecto al estímulo de VEGF, se ha observado que HIF-1 se encuentra asociado a la angiogénesis, mientras que el HIF-2 se asocia a la arteriogenesis. De la misma manera, ambos factores inducen la transcripción de la enzima superóxido dismutasa y de eritropoyetina (17,20,21).

Algunos estudios realizados por grupos como el de Semenza y cols, 2009 (14), mostraron que en ratas expuestas a HHI de manera prolongada aumentaba la densidad capilar del ventrículo izquierdo, generando un flujo pre-isquémico más alto y una mayor recuperación posterior a la isquemia y reperfusión. Este incremento podría explicar la cito-protección cardiovascular y la mayor duración en comparación con estímulos agudos (22).

1.4. Efectos sistémicos de hipoxia crónica

Durante la hipoxia crónica los mecanismos adaptativos iniciales son sobrepasados generando alteraciones patológicas tales como hipertensión arterial pulmonar e hipertensión sistémica, hipertrofia ventricular, y un aumento de la postcarga ventricular lo que resulta en disminución del gasto cardíaco asociado con una disminución en la respuesta simpática cardíaca secundaria a desensibilización de los receptores beta-adrenérgicos (1,2,23).

A nivel pulmonar la hipoxia induce vasoconstricción (hipóxica) que conlleva a un aumento de la presión de la arteria pulmonar, aumentando la postcarga del ventrículo derecho que desencadena la remodelación patológica del ventrículo provocando hipertrofia y eventualmente una falla cardíaca derecha (20).

A nivel periférico el aumento del estrés oxidativo y la mayor activación del factor de transcripción NF- κ B, aumenta la expresión de genes pro-inflamatorios tales como IL-1 β , TNF- α , moléculas de adhesión y TGF- β 1. Esto desencadena alteraciones en la pared arterial, producto de un cambio en el fenotipo del músculo liso, además de un desequilibrio entre la actividad de las metaloproteinasas y sus inhibidores, lo que llevará a la remodelación vascular periférica (24).

Dada la evidencia descrita, aparentemente la prolongación o cronicidad de la HHI es determinante en su efecto celular y tisular, generando una respuesta adaptativa vs. una respuesta mal adaptativa. Actualmente no existe evidencia clara que determine en que momento el estímulo hipóxico intermitente generará efectos dañinos en la función o estructura cardíaca.

1.5. Endotelio y vasodilatación mediada por NO

El endotelio es definido como un órgano, una monocapa celular en la cara interna de los vasos sanguíneos, que posee múltiples funciones entre las que destacan: el balance entre la vasoconstricción y la vasodilatación, efectos antitrombóticos, antimigratorios, antiproliferativos y antiinflamatorios (1).

El óxido nítrico (NO) es el principal mediador de la vasodilatación dependiente de endotelio. NO es generado por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS), a través de la cual se convierte la L-arginina en NO y citrulina (25). Una vez generado, el NO difunde hacia el músculo liso vascular y activa a la guanilato ciclasa soluble (sGC), aumentando los niveles de cGMP lo que disminuye la sensibilidad de los miofilamentos, provocando la relajación de la musculatura lisa (1, 26,27).

Disfunción endotelial. Esta condición se define como la incapacidad del endotelio de responder a estímulos vasodilatadores y a un predominio del tono vasoconstrictor. Esta menor capacidad vasodilatadora se ha asociado a un aumento de estrés oxidativo y/o hipoxia crónica (28). De hecho, en condiciones de hipoxia hipobárica intermitente, la capacidad vasodilatadora podría estar disminuída en parte por el aumento del estrés oxidativo ya que tanto el óxido nítrico como

su vía de señalización pueden verse afectadas (26,29). Además, las células endoteliales son reguladoras de la respuesta inflamatoria local y del tejido circundante, por lo tanto, la disfunción endotelial puede generar el aumento de la expresión de moléculas de adhesión de leucocitos y citoquinas pro-inflamatorias.

1.6. Otras formas de vasodilatación derivadas del endotelio

A pesar de que NO es el mediador vasodilatador más importante, este no es el único que se genera a nivel endotelial. Tal es el caso de las prostaciclina (PGI₂) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). Las prostaglandinas (PG) son generadas a partir del metabolismo del ácido araquidónico gracias a las ciclooxigenasas, que se activan a través de estímulos como el aumento del estrés tangencial (*shear stress*) y la acetilcolina. En estados fisiológicos se cree que juegan un papel menor en el control del tono vascular, no obstante, en condiciones patológicas como en la aterosclerosis en donde el NO disminuye su biodisponibilidad, las ciclooxigenasas aumentan su actividad de manera compensatoria otorgándole un papel de mayor importancia en la vasodilatación (30). Factores hiperpolarizantes derivados del endotelio son sustancias derivadas del endotelio que generan la hiperpolarización del músculo liso vascular, por la disminución intracelular de los niveles de potasio debido a su liberación del citosol. Además, se han identificado varias moléculas / mediadores que podrían actuar como factores vasodilatadores provenientes del endotelio (EDRF), entre ellos los metabolitos del citocromo P450 productos de lipoxigenasa, Peptido-C natriurético, la adenosina monofosfato cíclico, y algunas especies reactivas de oxígeno (H₂O₂) (30,31). En menor medida el monóxido de carbono (CO) generado de manera endógena también induce vasodilatación, a través del aumento del GMPc generando efectos intracelulares similares a los del NO pero con menor potencia (32).

1.7. Estrés oxidativo

A nivel celular existe un balance entre los procesos de oxidación y reducción, conocido como homeostasis oxido-reductora (tono redox). Su desbalance hacia un estado pro-oxidante que supera la capacidad antioxidante, es denominado estrés oxidativo, factor directamente relacionado con el daño a las biomoléculas (33,34). Este desbalance es generado por aumento de

las especies reactivas, vale decir átomos o moléculas con un electrón desapareado, por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno, radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) (26). Este electrón desapareado, determina su alta reactividad por las biomoléculas, generando la oxidación de estas últimas, y eventualmente alterando su estructura y función (35). Por otra parte, las fuentes de antioxidantes se pueden dividir en no enzimáticas (GSH/GSSG, entre otras), y enzimáticas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa).

Además de un estado pro-oxidante, el estrés oxidativo puede estar determinado por una menor eficiencia de los mecanismos de defensa antioxidante enzimático o no enzimático (34). En la hipoxia intermitente aumenta la producción de diferentes ERO, destacando al $\bullet\text{O}_2^-$ el cual presenta una fuerte afinidad con el NO, generando peroxinitrito y anulando su acción vasodilatadora. Además, la oxidación del cofactor tetrahidrobiopterina (BH_4) y otros factores asociados a la eNOS desacoplan esta enzima disminuyendo la producción de NO, y favoreciendo la liberación de anión superóxido, peroxinitrito, y lipoperoxidación (35,23).

Para estudiar las respuestas cardiovasculares a HHI se han desarrollado modelos animales, como los estudiados por Herrera y cols (16), que consta de la inducción de HHI a través de ciclos de exposición a hipoxia/normoxia de 4 días respectivamente, por 4 ciclos consecutivos (32 días totales). Por medio de este modelo se ha logrado observar efectos adaptativos representados a través de la mejoría de la capacidad antioxidante y la función ventricular. Pese a esto, la determinación de los cambios morfo-funcionales a nivel cardiovascular en el tiempo aún no están del todo claros. Por lo tanto, resulta razonable plantear un protocolo con distintos tiempos de exposición a HHI (aguda y crónica) para comparar y definir un eventual efecto preconditionante o deletéreo. Es por esto, que en esta Tesis se indagará en los efectos cardiovasculares, a nivel funcional y estructural, que tiene una exposición a HHI de 4 y 12 ciclos.

HIPÓTESIS

La exposición a hipoxia hipobárica intermitente de 4 ciclos (aguda) tendrá un efecto adaptativo, con preservación de la función, la estructura y el tono oxidativo cardiovascular. En contraste, la HHI de 12 ciclos (crónica), generará un efecto mal adaptativo, con disfunción cardiovascular, remodelamiento patológico y estrés oxidativo cardíaco.

OBJETIVOS

- 1.- Determinar y comparar la morfología y función cardíaca *in vivo*, post exposición a hipoxia hipobárica intermitente aguda y crónica en ratas, a través de parámetros ecocardiográficos (fracción de eyección% (FE) y % fraccional acortamiento (FA), diámetro de fin de diástole y sístole, y grosor septum interventricular).
- 2.- Determinar y comparar la función vascular *ex vivo* posterior a la exposición a hipoxia hipobárica intermitente aguda y crónica en ratas, a través parámetros de reactividad carotídea y femoral mediante miografía de alambre.
- 3.- Determinar y comparar marcadores de estrés oxidativo, enzimas antioxidantes y generación de Especies reactivad de oxígeno (ERO) cardiacos, posterior a la exposición hipóxica hipobárica aguda y crónica en ratas adultas.
- 4.- Determinar y comparar la remodelación cardíaca y vascular post exposición a hipoxia hipobárica intermitente aguda y crónica en ratas a través de análisis histológicos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta Tesis fue financiada por los Proyectos Santander-Universia 2015 y Fondecyt 1151119. Todos los manejos y cuidados de 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).

2.1. Modelo de estudio

En este estudio se utilizaron 24 ratas Wistar, machos, de 8 semanas de edad (200-250 gr), las que fueron divididas en 4 grupos de igual número de manera aleatoria. Dos de estos grupos se mantuvieron expuestos a aire ambiental como controles normóxicos (520 msnm, ~750 Torr, FiO₂ 21%), mientras que los grupos intervenidos se mantuvieron en hipoxia hipobárica inducida en una cámara hipobárica (4,600 m de altitud simulada, 428 Torr, FiO₂ 21%). Cada ciclo constó de 4 días en hipoxia hipobárica y 4 días en normoxia. Un grupo se mantuvo durante 4 ciclos (hipoxia intermitente aguda) mientras que el segundo grupo se mantuvo por 12 ciclos (hipoxia intermitente crónica). Las ratas fueron mantenidas en jaulas transparentes con 2 ratas x jaula, entre 22-25° de temperatura ambiental, 45-55% de humedad ambiental, fotoperíodo 12/12, alimentación con dieta estándar y agua *ad libitum* (Fig. 7.1 Anexos).

2.2. Función y morfología cardíaca *in vivo*

La función cardíaca fue evaluada a través de ecocardiograma, para lo cual todas las ratas fueron anestesiadas vía inhalatoria con isofluorano (1,5%) en oxígeno, para disminuir el estrés del animal y evitar posibles artefactos por el movimiento. Posterior a esto el tórax de las ratas fue depilado en torno al eje cardíaco (36,37). La función ventricular sistólica fue evaluada a través de la FE, parámetro que mide la diferencia del volumen entre la sístole/diástole del ventrículo izquierdo y mediante FA parámetro que mide la diferencia del diámetro entre la sístole/diástole del ventrículo izquierdo (38,39,40,41). Se obtuvo además los valores de diámetros ventriculares y espesores de las paredes. Los exámenes ecocardiográficos se realizaron, por el mismo operador, al terminar los ciclos 1, 4 y 12 de HHI y sus tiempos equivalentes en los animales normóxicos (controles).

Una vez finalizado el período de experimentación, todos los animales fueron eutanasiados por sobredosis anestésica (Tiopental 150 mg/kg). Una vez confirmada la muerte por paro cardio-respiratorio, se procedió a la extracción del corazón y las arterias femorales y carótidas.

2.3. Función vascular

La función vascular fue evaluada en la arteria femoral y carotida a través de miografía de alambre. Ambas arterias se mantuvieron en solución de Krebs a 4°C donde fueron cuidadosamente limpiadas y cortadas en anillos de 2 mm de largo. Posteriormente, 2 de los anillos de montaron en un miógrafo de alambre (DMT620M, DanishMyo Technologies, Denmark), sumergidos en Krebs y burbujeado continuo con 5% de CO₂ y 95% de O₂ a 37° C (42,43).

Después de un periodo de equilibrio de 15 minutos, los anillos vasculares fueron estirados de una manera escalonada a una tensión equivalente normalizada, para lograr una presión transmural fisiológica (~80 mmHg), ya que la respuesta vascular es dependiente del grado de tensión, simulando la condición *in vivo* (42,43). Posteriormente se mantuvieron de 15-20 minutos en solución de Krebs, luego de lo cual se determinó la capacidad contráctil administrando dosis incrementales de K⁺ (4,72 – 124 mM). Además, se evaluó la función vasoconstrictora mediante dosis ascendentes de fenilefrina (PE, 10⁻¹⁰-10⁻⁴ mol/L) en femorales y serotonina (5Ht, 10⁻¹⁰-10⁻⁴ mol/L) en carotidas. La capacidad vasodilatadora se determinó a través del uso de dosis crecientes de nitroprusiato de sodio (SNP, 10⁻¹⁰-10⁻³ mol/L) y metacolina (MetCh, 10⁻¹⁰-10⁻⁴ mol/L). Para determinar la acción del NO en la vasodilatación, se repitió la curva con metacolina, en presencia de un bloqueador de la óxido nítrico sintasa (L-NAME, 10⁻⁵ mol/L). Adicionalmente, para determinar el rol de prostanoïdes en la vasodilatación, se repitió la curva con metacolina, en presencia de indometacina (10⁻⁶ mol/L), un inhibidor no selectivo de las ciclooxigenasas (COX). Para el análisis de la respuesta tanto vasodilatadora como vasoconstrictora a los diferentes fármacos vasoactivos se realizó un ajuste a una curva dosis-respuesta (agonista-efecto) de modo tal de obtener una respuesta máxima (Emax o Kmax) y la sensibilidad (EC50 o pD2). Además, para las curvas con bloqueo de eNOS e inhibición de COX, se calcularon las áreas bajo la curva (AUC) para estimar el rol de dichas vías vasodilatadoras (44).

2.4. Marcadores de hipoxia y estrés oxidativo

Posterior a la eutanasia de las ratas, el corazón fue dividido en 2 en un corte medio transversal. Un segmento fue congelado y otro fijado en formaldehído al 4%.

En el tejido congelado, se determinó los niveles de expresión proteica de HIF-1 y HIF-2 mediante *Western Blot*, utilizando los anticuerpos anti-HIF-1 (sc-10790; 1:250 dilución; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) y anti-HIF-2 (NB 100-122; Novus Biological, Inc), respectivamente.

Además, para determinar el nivel de estrés oxidativo, se midió 8-isoprostanos con un kit de inmunoensayo (Cayman 516351), y 4-Hidroxinonenal (4-HNE) por *Western Blot* con anticuerpo específico anti-4-HNE (Abcam Laboratories, ab46545). Para determinar el estrés nitrosativo, se cuantificó nitrotirosina (NT) por *Western Blot* con el anticuerpo anti-NT (Millipore, 05-233, Darmstadt, Germany) (15, 45).

2.5. Enzimas antioxidantes cardíacas

Se determinó la expresión proteica de las enzimas antioxidantes manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSH-Px-1), mediante *Western blot* con anticuerpos específicos, anti-Mn-SOD (Millipore, 06-984;), anti-catalasa (Abcam Laboratories, ab1877and) y anti-GSH-PX-1 (Abcam Laboratories, ab22604), respectivamente (15,43).

Además, se midieron las actividades enzimáticas de SOD, CAT y GSH-PX con ensayos comerciales (SOD Assay kit-WST, BioVision, #K335-100; OxiSelect™ Catalase Activity Assay Kit, Colorimetric, Cell Biolabs, INC, #STA 341; y Gluthathione Peroxidase Assay Kit, Cayman, #703102) (46).

2.6. Fuentes productoras de especies reactivas de oxígeno

Determinamos la generación de $\bullet\text{O}_2^-$ mediante la oxidación de 10 μM de DHE (470Ex / 590Em) después de una incubación de 30 minutos a 37 °C con el tejido homogeneizado (20-50 μg de proteína). Además, la actividad de NADPH oxidasa se determinó en función de la tasa de consumo de NADPH, monitorizado a 340 nm a 37 °C. El ensayo se realizó en una solución que contenía 50 mM tampón fosfato, pH 7,0, EDTA 1 mM, sacarosa 150 mM y homogenizado tisular (20-50 μg de proteína). La reacción enzimática se inició añadiendo 0,1 mM de NADPH y la actividad NADPH se calculó como μmoles de NADPH oxidado/mg de proteína/min (47).

2.7. Histología cardíaca y vascular

Inmediatamente posterior a la eutanasia, se obtuvieron cortes transversales de corazón y anillos de arteria aorta, femoral y carótida, los cuales fueron fijados en formaldehído 4% durante 24 horas, incluidos en parafina y cortados en láminas de 5 μm de espesor. Posteriormente, estos cortes se sometieron a una tinción de Van Gieson, que permite la observación y cuantificación de la densidad de fibras de elastina y colágeno, la densidad celular y las características estructurales del tejido. Los cortes fueron observados en un microscopio de luz y fotografiados para su posterior análisis digital (44,45).

2.8. Análisis estadístico

El tamaño de muestra se determinó justificado para obtener resultados estadísticamente válidos para lo cual se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = 2 \times \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \times \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$$

Dónde: Z_{α} = valor absoluto del error alpha; Z_{β} = valor absoluto del error beta; δ = desviación estándar; $\mu_1 - \mu_2$ = % diferencia de resultados esperados, para esto consideramos al error α en 5%, error β en 20%, para lo cual se analizará como resultado los valores de estrés oxidativo, con una diferencia esperada de 30% al comparar el grupo expuesto hipoxia intermitente aguda versus a los expuestos a hipoxia intermitente prolongada (48,14).

$$5,79 = 2 \times \frac{(1,96 + 0,84)^2 + (18)^2}{(30)^2}$$

Esto arroja un $n=5.79$ ratas por grupo. Siendo la intervención realizada en 4 grupos, esto da un número total aproximado de 24 ratas.

Los valores se expresaron como promedio \pm error estándar de la media (ESM). Se chequeó distribución no normal, mediante el Test de Shapiro–Wilk.

Las comparaciones de las variables entre dos grupos se realizaron mediante la prueba no paramétrica, Mann-Whitney. Se consideró un $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

3. RESULTADOS

3.1. Determinación y análisis de parámetros ecocardiográficos

Grupos agudos

Con respecto a la función sistólica, fue posible observar un aumento de 22,85% al final del primer ciclo y de 7,88% al final del cuarto ciclo en la FE en las ratas expuestas a HIA en comparación a los controles. La FA en el primer ciclo no presentó diferencia, mientras que al término del 4^{to} ciclo se observó un aumento de FA de 9,56% en el grupo HIA (Fig. 1). La frecuencia cardíaca no presentó diferencia al término del primer ciclo, observando un aumento del 18,81% de esta al término del cuarto ciclo (Tabla 1).

En cuanto a las mediciones morfométricas, el espesor del tabique interventricular en diástole fue similar entre grupos. En contraste, el diámetro ventricular en sístole disminuyó 28,32% al término del primer ciclo. Adicionalmente, el diámetro ventricular en diástole disminuyó 20,87% y el diámetro ventricular en sístole disminuyó 33,41%, mientras que la frecuencia cardíaca aumentó 18,81% al término del cuarto ciclo (Tabla 1).

Tabla 1. Variables ecocardiográficas en primer y cuarto ciclo.

Variable	NA1	HIA1	NA4	HIA4
DVID (mm)	7,13 ± 0,42	6,49 ± 0,37	7,52 ± 0,16	5,95 ± 0,39*
DVIS (mm)	4,13 ± 0,33	2,96 ± 0,30*	3,98 ± 0,11	2,64 ± 0,39*
TIVD (mm)	1,57 ± 0,10	1,60 ± 0,10	1,76 ± 0,14	2,00 ± 0,12
PLVI (mm)	2,14 ± 0,24	2,98 ± 0,27	2,83 ± 0,13	3,03 ± 0,19
DAI (mm)	3,91 ± 0,19	3,53 ± 0,32	4,45 ± 0,11	3,87 ± 0,35
DA (mm)	3,33 ± 0,21	3,09 ± 0,14	2,96 ± 0,15	2,41 ± 0,17
FC (lpm)	242,4 ± 19,3	243,1 ± 8,2	220,3 ± 11,7	261,5 ± 15,4*

Diámetro del ventrículo izquierdo en diástole (DVID) expresado en milímetros (mm), Diámetro del ventrículo izquierdo en sístole (DVIS) expresado en mm, y tabique interventricular en diástole (TIVD) expresado en mm, pared libre del ventrículo izquierdo en diástole (PLVI) expresado en mm, diámetro de la aurícula izquierda (DAI), diámetro aórtico (DA) y frecuencia cardíaca (FC) medida en latidos por minuto (lpm); al término del primer ciclo y al término del cuarto ciclo. Los grupos son NA1: normoxia post 1^{er} ciclo, HIA1: hipoxia post 1^{er} ciclo; NA4: normoxia post 4^{to}, HIA4: hipoxia post 4^{to} ciclo. Los datos son expresados en promedios ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) = * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6).

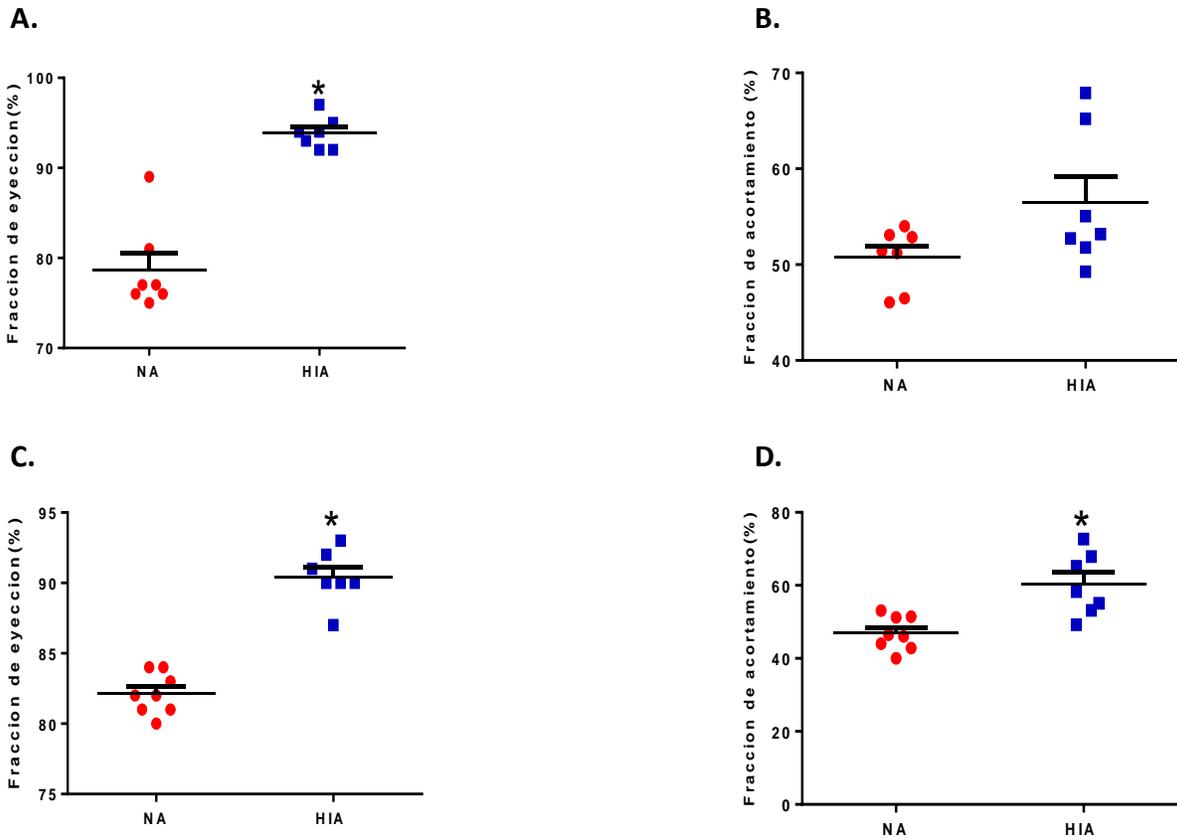


Figura 1. Fracción de eyección (FE) y Fracción de acortamiento (FA). FE y FA valoradas en porcentaje (%), de los grupos hipoxia hipobárica intermitente aguda (HIA) frente al grupo control agudo (NA), al término del primer ciclo (A,B) y al término del cuarto ciclo (C,D). Los resultados son expresados en promedio \pm ESM. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIA vs NA ($n = \text{HIA}:6, \text{NA}:6$).

Grupos crónicos

No se observaron diferencias en la FE ni en la FA al comparar HIC con sus controles. Sin embargo, la frecuencia cardiaca aumentó un 17,19% en HIC (Fig. 2). En cuanto a las mediciones morfométricas, el diámetro ventricular izquierdo en diástole (DVID) disminuyó un 24,70% y el diámetro de la aurícula izquierda (DAI) presentó un aumento del 28,49% en relación al control. Por otro lado, el diámetro ventricular izquierdo en sístole, el tabique interventricular en diástole (TIVD), la pared libre del ventrículo izquierdo (PLVI) y el diámetro de la arteria aorta (DA) no presentaron diferencias significativas (Tabla 2).

Tabla 2. Variables ecocardiográficas en grupos crónicos

Variable	NC	HIC
DVID (mm)	8,34 ± 0,51	6,28 ± 0,45*
DVIS (mm)	4,68 ± 0,44	3,40 ± 0,38
TIVD (mm)	2,96 ± 0,06	3,12 ± 0,39
PLVI (mm)	2,76 ± 0,22	3,05 ± 0,17
DAI (mm)	3,93 ± 0,23	5,05 ± 0,46*
DA (mm)	1,95 ± 0,11	1,90 ± 0,11
FC (lpm)	195,40 ± 10,53	229 ± 11,23*

Diámetro del ventrículo izquierdo en diástole (DVID) expresado en centímetros (mm), Diámetro del ventrículo izquierdo en sístole (DVIS) expresado en mm, y tabique interventricular en diástole (TIVD) expresado en mm, pared libre del ventrículo izquierdo en diástole (PLVI) expresado en mm, diámetro de la aurícula izquierda (DAI), diámetro aórtico (DA) y frecuencia cardíaca (FC) medida en latidos por minuto (lpm) Los datos son expresados en promedio ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIC vs NC (n= HIC:5, NC:5).

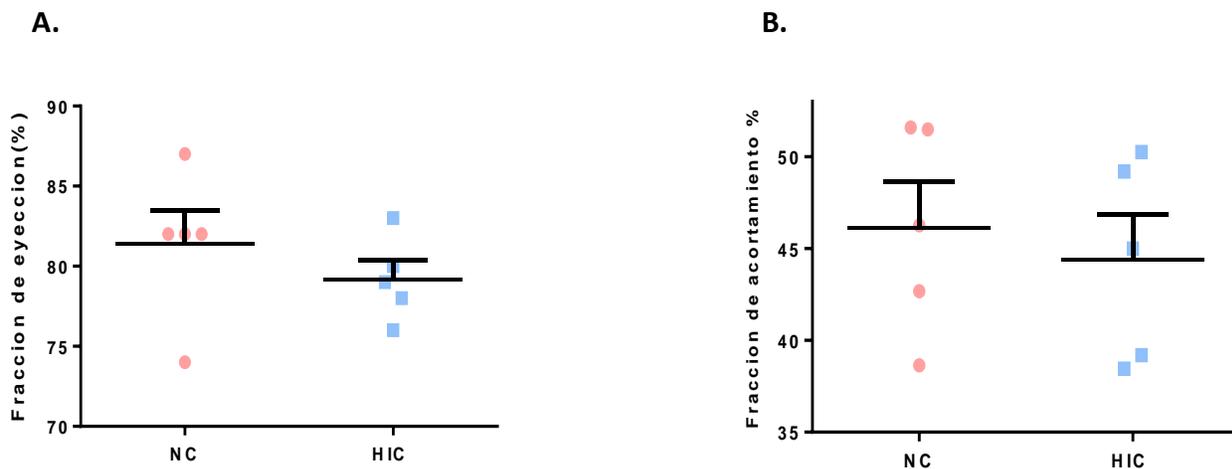


Figura 2. Fracción de eyección (FE) y Fracción de acortamiento (FA). FE (A) y FA (B) valoradas en porcentaje (%), de los grupos hipoxia hipobárica intermitente crónica (HIC) frente al grupo control crónico (NC), al término del ciclo 12. Los resultados son expresados en promedio ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIC vs NC (n= HIC:5, NC:5).

3.2. Reactividad vascular

Función vascular carotídea en exposición aguda. Las dosis ascendentes de potasio (K+) indujeron una vasoconstricción progresiva en todos los grupos. Las ratas HIA no presentaron diferencias en la sensibilidad (EC_{50} HIA: 25,07mM ± 3,81 vs EC_{50} NA: 28,46mM ± 3,47) pero si una mayor capacidad contráctil (E_{max} HIA: 4,20N/M ± 0,28 vs E_{max} NA: 3,08 N/M ± 0,19)

respecto al control (Fig. 3). En contraste, serotonina (5HT) indujo igual efecto máximo (Emax HIA: 164,50% ± 18,48 vs Emax NA: 191,60% ± 11,13) pero mayor sensibilidad (pD2 HIA: 6,77 ± 0,32 vs pD2 NA: 5,91 ± 0,14) respecto a NA (Fig. 3).

A la vez, la vasodilatación inducida por SNP presentó una relajación máxima similar (Rmax HIA: 34,38% ± 3,07 vs Rmax NA: 31,09 ± 2,18), pero con una sensibilidad mayor en las ratas HIA (pD2 HIA: 7,64 ± 0,16 vs pD2 NA: 7,07 ± 0,10).

Por otro lado, la relajación inducida por metacolina (MetCh) no presentó diferencias entre grupos, tanto en sensibilidad (pD2 HIA: 8,39 ± 0,31 vs pD2 NA: 8,26 ± 0,41) como en respuesta máxima (Rmax HIA: 26,86 % ± 11,95 vs Rmax NA: 52,65% ± 6,11) (Fig. 4). Al repetir la curva de MetCh con bloqueo de L-NAME, tampoco se encontraron diferencias entre grupos (pD2 HIA: 6,83 ± 2,13 vs pD2 NA: 8,89 ± 0,46; Rmax HIA: 16,88% ± 7,90 vs Rmax NA: 25,36% ± 4,60). En contraste, al agregar indometacina, se observó una menor sensibilidad (pD2 HIA: 6,38 ± 0,88 vs pD2 NA: 9,01 ± 0,49) y mayor respuesta vasodilatadora máxima (Rmax HIA: 15,29% ± 4,14 vs Rmax NA: 45,76% ± 5,52) en HIA con respecto a su control (Fig. 4). No se observaron diferencias significativas en las áreas bajo la curva, ni en la comparación del % de vasodilatación independiente de NO. Por otro lado, al comparar el porcentaje de vasodilatación de los grupos con bloqueo con L NAME en relación al 100% del estímulo de MetCh se observó una mejor vasodilatación de HIA en 54% (Fig. 4).

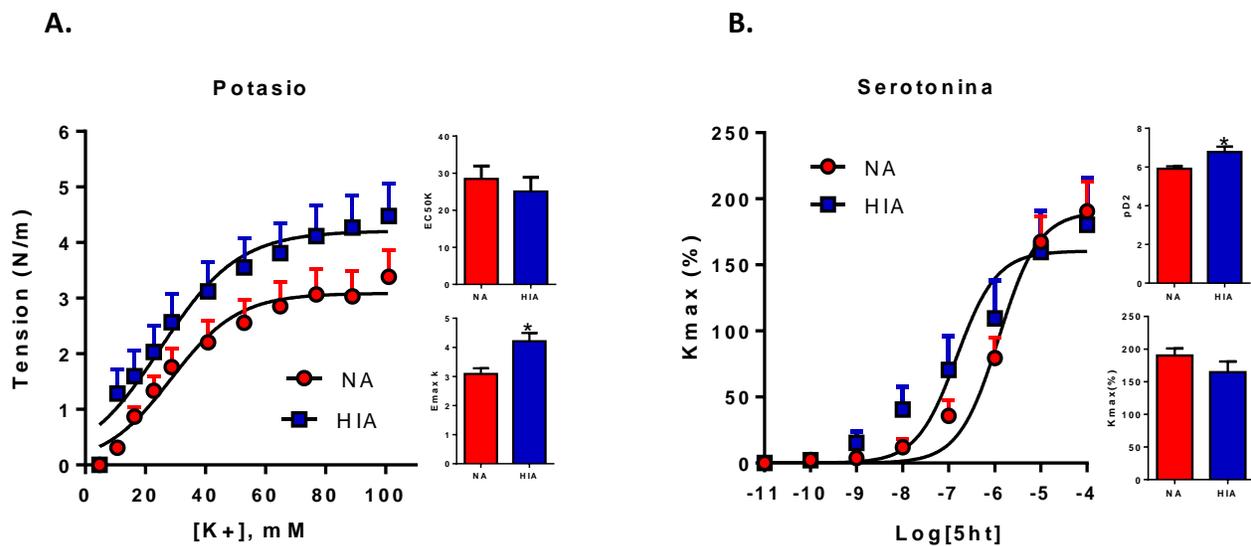


Figura 3. Función vasoconstrictora en arterias carótidas. La vasoconstricción fue inducida por (A) Potasio (K+) y (B) Serotonina (5HT). Los datos son expresados en promedios ± ESM, la respuesta máxima se expresa en Emax y Kmax, la sensibilidad es expresada por EC50 y pD2. Diferencias estadísticamente significativas: P<0,05=*. (HIA vs/ NA), (n= HIA:6, NA:6).

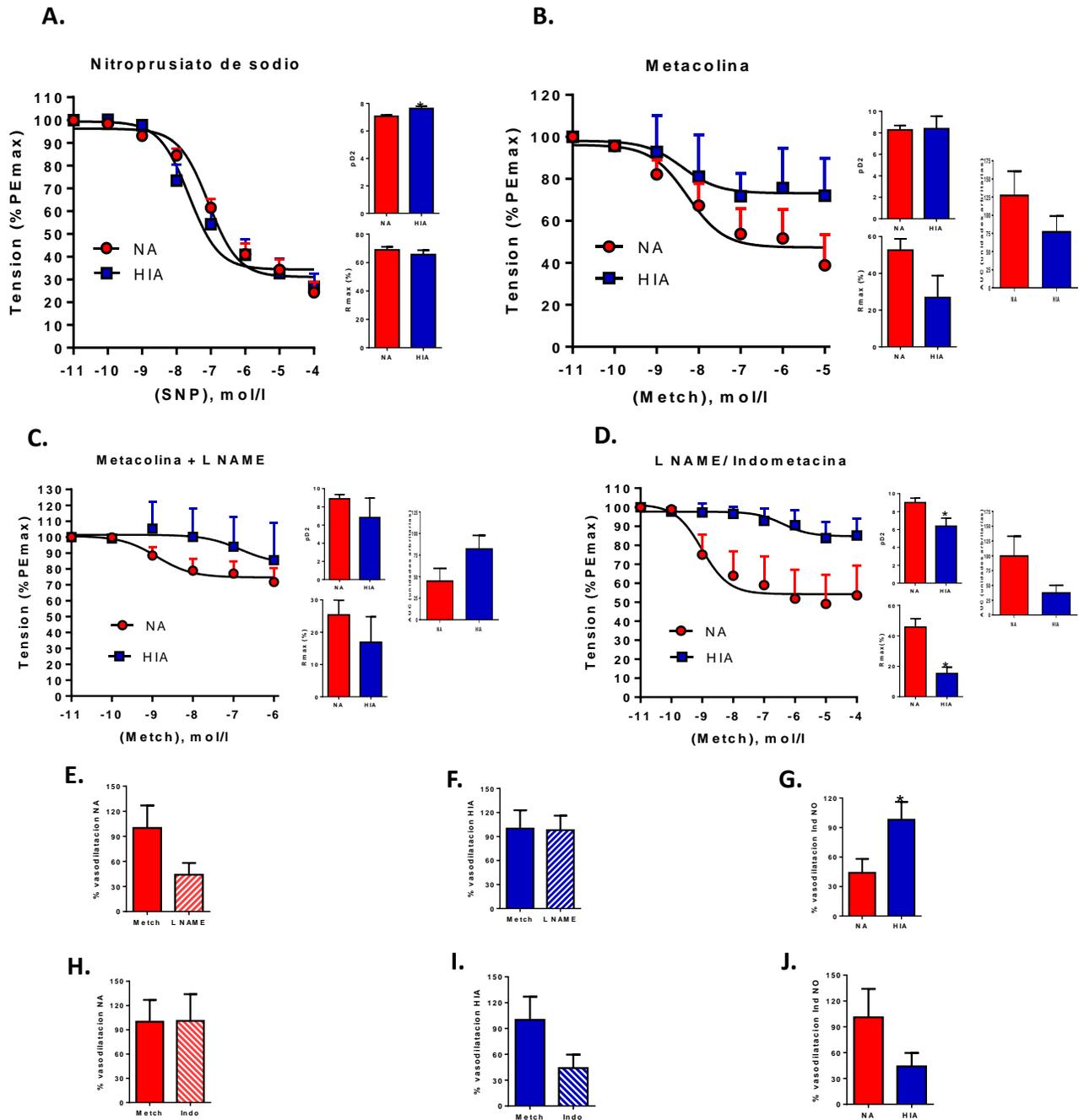


Figura 4. Función vasodilatadora en arterias carótidas. La vasodilatación fue inducida por SNP, Metacolina, Metacolina + L-NAME y Metacolina + L-NAME/Indometacina. Los datos son expresados en promedios \pm ESM, Área bajo la curva (AUC) medido en unidades arbitrarias la sensibilidad expresada por pD2 y vasodilatación máxima en Rmax. **(A)** SNP, **(B)** Metacolina, **(C)** bloqueo con L-NAME, **(D)** bloqueo con L-NAME/indometacina, **(E)** porcentaje de vasodilatación NA sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo (L-NAME), **(F)** porcentaje de vasodilatación HIA sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo (L-NAME/Indometacina), **(G)** porcentaje de vasodilatación independiente de NO. **(H)** porcentaje de vasodilatación NA sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo (L-NAME/Indometacina), **(I)** porcentaje de vasodilatación HIA sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo (L-NAME), **(J)** porcentaje de vasodilatación bloqueo (L-NAME/Indometacina) NA v/s HIA. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6).

Función vascular femoral en exposición aguda. La vasoconstricción inducida por K⁺ muestra una mayor sensibilidad en el grupo HIA (EC₅₀ HIA: 20,76 mM ± 1,83 vs EC₅₀ NA: 25,05mM ± 1,49), sin diferencias en el efecto máximo (E_{max} HIA: 9,01 ± 0,38 vs E_{max} NA: 7,91 ± 0,30). Por otro lado, la vasoconstricción inducida por fenilefrina presentó una mayor sensibilidad (pD₂ HIA: 6,30 ± 0,17 vs pD₂ NA: 4,97 ± 0,14) y efecto máximo (E_{max} HIA: 125,30% ± 7,16 y E_{max} NA: 81,46% ± 6,66) en el grupo HIA (Fig. 5). En contraste, la vasodilatación inducida por SNP tuvo una relajación máxima similar en ambos grupos (R_{max} HIA: 86,59% ± 2,00 vs R_{max} NA: 87,14% ± 1,96), pero con una sensibilidad mayor en las ratas HIA (pD₂ HIA: 8,04 ± 0,08 vs pD₂ NA: 7,41 ± 0,07). Además, la relajación inducida por metacolina indujo una respuesta máxima menor en HIA (R_{max} HIA: 34,80% ± 10,73 vs R_{max} NA: 61,04% ± 4,11), con una sensibilidad similar (pD₂ HIA: 9,36 ± 0,44 vs pD₂ NA: 8,61 ± 0,16) respecto al grupo control (Fig. 6). Por otro lado, al administrar L-NAME, la vasodilatación inducida por metacolina no presenta diferencias entre grupos (pD₂ HIA: 8,06 ± 0,39 y pD₂ NA: 9,45 ± 0,64; R_{max} HIA: 40,08% ± 4,45 vs R_{max} NA: 47,59% ± 7,37). En contraste, al administrar L-NAME + Indometacina, se observa una mayor sensibilidad de NA (pD₂ HIA: 7,15 ± 0,31 vs pD₂ NA: 8,88 ± 0,52) sin diferencias en el efecto máximo (R_{max} HIA: 52,57% ± 8,27 vs R_{max} NA: 43,29% ± 8,17) (Fig. 6). En estos ensayos, no se observaron diferencias significativas en las áreas bajo la curva.

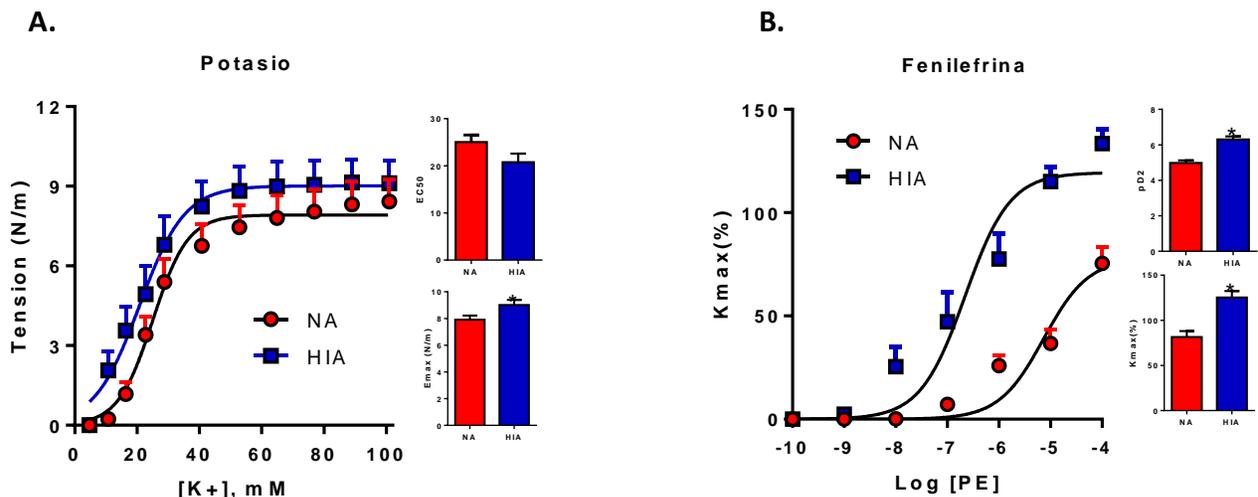


Figura 5. Función vasoconstrictora en arterias femorales. La vasoconstricción fue inducida por (A) Potasio (K⁺) y (B) Fenilefrina (PE). Datos expresados en promedios ± ESM, la respuesta máxima se expresa en E_{max} y K_{max}, la sensibilidad es expresada por EC₅₀ y pD₂. Diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) = * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6).

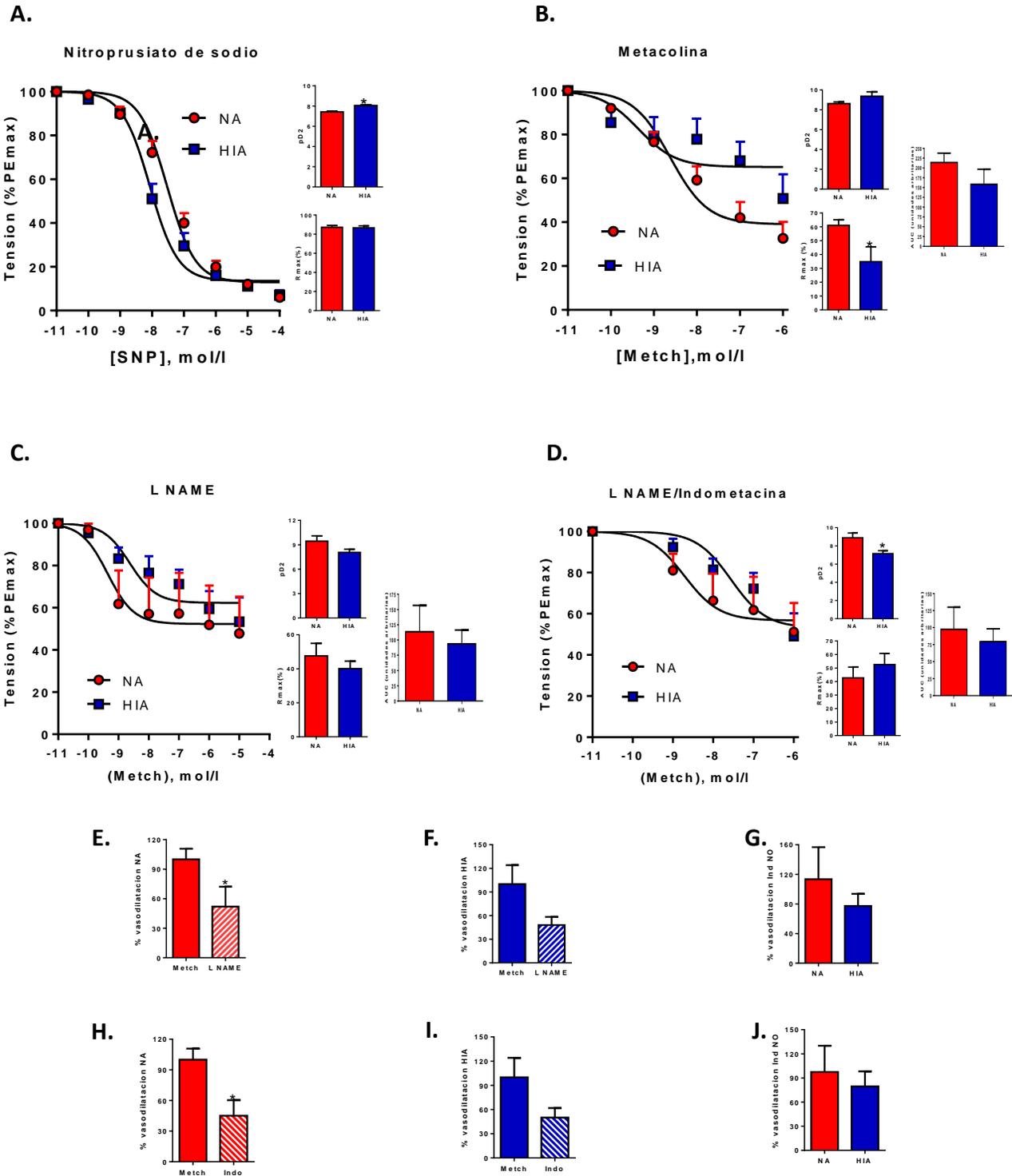


Figura 6. Función vasodilatadora en arterias femorales. La vasodilatación fue inducida por SNP, Metacolina, Metacolina + L-NAME y Metacolina + L-NAME/Indometacina. Los datos son expresados en promedios \pm ESM, Área bajo la curva (AUC) medido en unidades arbitrarias la sensibilidad expresada por pD2 y vasodilatación máxima en Rmax. **(A)** SNP, **(B)** Metacolina, **(C)** bloqueo con L-NAME, **(D)** bloqueo con L-NAME/indometacina, **(E)** porcentaje de vasodilatación NA sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo (L-NAME), **(F)** porcentaje de vasodilatación HIA sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo (L-NAME), **(G)** porcentaje de vasodilatación independiente de NO **(H)** porcentaje de vasodilatación NA sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo (L-NAME/Indometacina), **(I)** porcentaje de vasodilatación HIA sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo (L-NAME), **(J)** porcentaje de vasodilatación bloqueo (L-NAME/Indometacina) NA v/s HIA. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6).

Función vascular carotídea en exposición crónica. La vasoconstricción de las carótidas estimulada por K⁺, no presentó diferencias en la sensibilidad (EC50 HIC: 30,20mM ± 1,67 vs EC50 NC: 29,88mM ± 2,61) entre grupos crónicos. Por el contrario, se observó una menor respuesta máxima (Emax HIC: 3,97N/M ± 0,12 vs Emax NC: 4,78N/M ± 0,22) del grupo HIC comparado con NC. En la curva-respuesta a serotonina, HIC presentó menor sensibilidad (pD2 HIC: 5,53 ± 0,27 vs pD2 NC: 6,26 ± 0,36), pero sin diferencias en su efecto vasoconstrictor máximo (Emax HIC: 105,84% ± 10,26 vs Emax NC: 98,56% ± 9,80) (Fig. 7). Al estimular la vasodilatación de las carótidas con SNP, se observa una mayor sensibilidad (pD2 HIC: 7,22 ± 0,08 vs pD2 NC: 6,83 ± 0,13) y vasodilatación máxima para el grupo HIC (Rmax HIC: 79,15% ± 2,00 vs Rmax NC: 52,75% ± 2,57) (Fig.8). Por otro lado, al inducir la vasodilatación a través de metacolina, destaca un mayor efecto máximo (Rmax HIC: 57,22% ± 2,26 vs Rmax NC: 32,69% ± 6,78), y sensibilidad (pD2 HIC: 9,25 ± 0,11 vs pD2 NC: 8,63 ± 0,56) de HIC en comparación con NC. Este efecto máximo se mantuvo incluso al incubarse con L-NAME (Rmax HIC: 54,32% ± 3,24 vs Rmax NC: 15,38% ± 4,66; pD2 HIC: 8,54 ± 0,21 vs pD2 NC: 9,32 ± 1,07) y L-NAME+Indometacina (Rmax HIC: 73,07% ± 3,57 vs Rmax NC: 62,20% ± 2,84; pD2 HIC: 8,84 ± 0,16 vs pD2 NC: 8,76 ± 0,15), sin presentar diferencias en la sensibilidad (Fig. 8). No se observaron diferencias significativas en las áreas bajo la curva, en ninguno de los bloqueos.

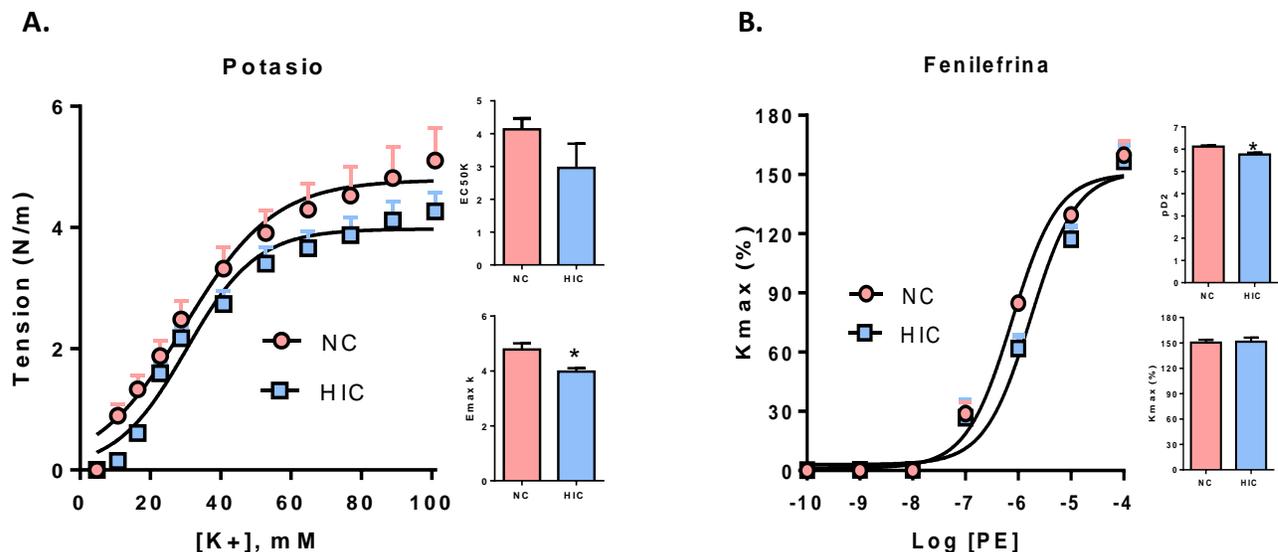


Figura 7. Función vasoconstrictora en arterias carótidas. La vasoconstricción fue inducida por (A) Potasio (K⁺) y (B) Fenilefrina (PE). Los datos son expresados en promedios ± ESM, la respuesta máxima se expresa en Emax y Kmax, y la sensibilidad es expresada por EC50 y pD2. Diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) = * HIC vs NC (n= HIC:6, NC:6).

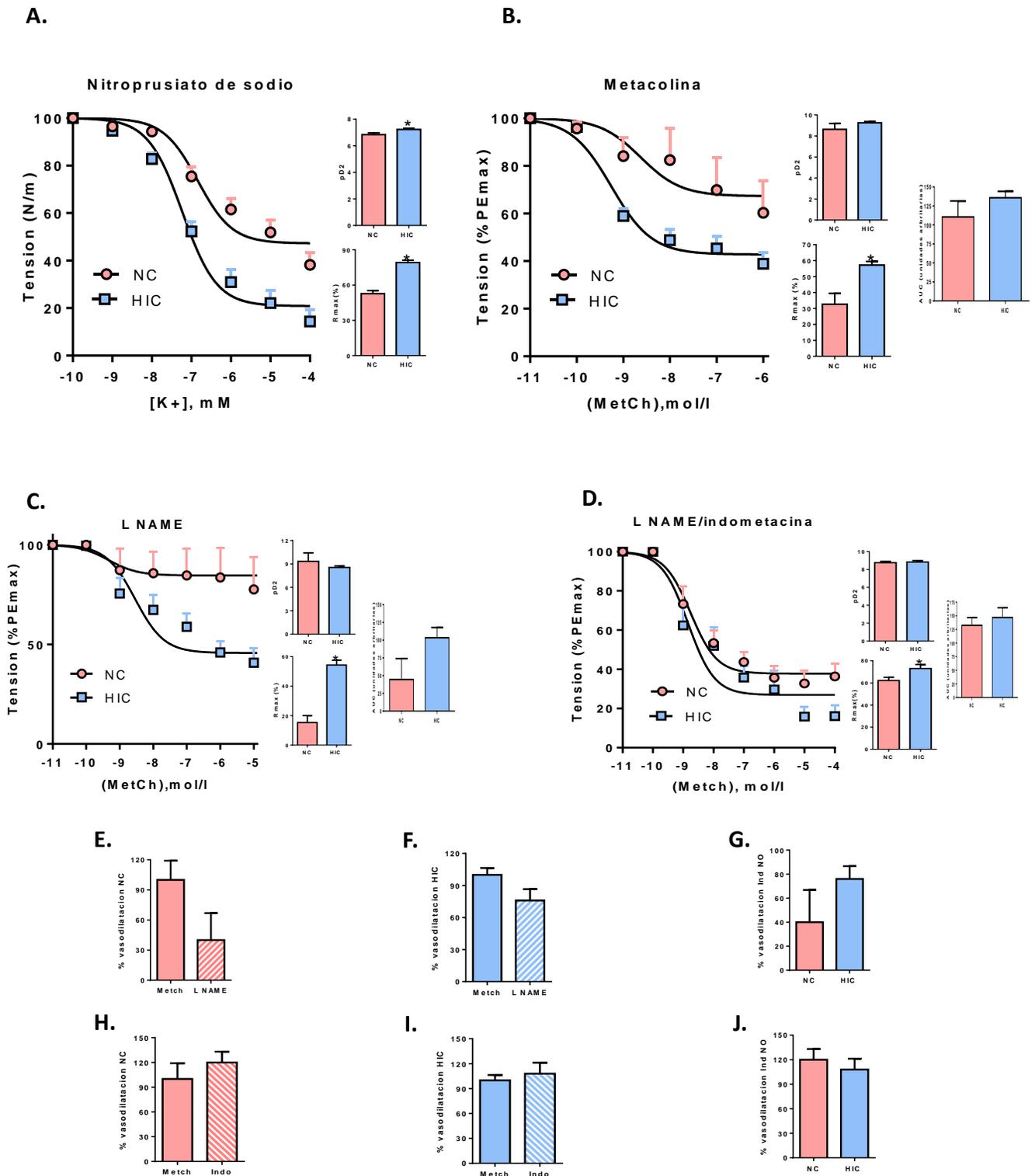


Figura 8. Función vasodilatadora en arterias carótidas. La vasodilatación fue inducida por SNP, Metacolina, Metacolina + L-NAME y Metacolina + L-NAME/Indometacina. Los datos son expresados en promedios \pm ESM, Área bajo la curva (AUC) medido en unidades arbitrarias la sensibilidad expresada por pD2 y vasodilatación máxima en Rmax. **(A)**SNP, **(B)**Metacolina, **(C)**bloqueo L-NAME, **(D)**bloqueo L-NAME/indometacina, **(E)**porcentaje de vasodilatación NA sin bloqueo de L-NAME(No) y con bloqueo (L-NAME), **(F)** porcentaje de vasodilatación HIC sin bloqueo de L-NAME(No) y con bloqueo (L-NAME), **(G)** porcentaje de vasodilatación independiente de NO **(H)** porcentaje de vasodilatación NA sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo (L-NAME/Indometacina), **(I)** porcentaje de vasodilatación HIC sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo (L-NAME), **(J)** porcentaje de vasodilatación bloqueo (L-NAME/Indometacina) NC v/s HIC. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIC vs NC (n= HIC:6, NC:6).

Función vascular femoral en exposición crónica. La vasoconstricción inducida por K⁺ en las arterias femorales no presentó diferencias en la sensibilidad (EC₅₀ HIC: 28,73mM ± 5,02 vs EC₅₀ NC: 22,86mM ± 2,18). Sin embargo, se observó menor capacidad contráctil en HIC (E_{max} HIC: 6,10N/M ± 0,29 vs E_{max} NC: 7,22N/M ± 0,3) en comparación con NC. Sin embargo, la respuesta a fenilefrina fue similar entre grupos (pD₂ HIC: 5,53 ± 0,27 vs pD₂ NC: 6,26 ± 0,36; E_{max} HIC: 105,80% ± 10,26 vs E_{max} NC: 98,56% ± 9,85) (Fig. 9). Asimismo, la capacidad vasodilatadora inducida por SNP presentó diferencias entre grupos (pD₂ HIC: 7,19 ± 0,11 vs pD₂ NC: 7,56 ± 0,15; R_{max} HIC: 68,88% ± 2,24 vs R_{max} NC: 65,55% ± 2,86) (Fig. 10). No obstante, ante la estimulación por metacolina, el grupo HIC presentó una menor sensibilidad (pD₂ HIC: 5,97 ± 0,86 vs NC: 9,31 ± 0,80) y relajación máxima (R_{max} HIC: -21,80% ± 8,48 vs R_{max} NC: 23,98% ± 3,98) (Fig. 10). De hecho, el grupo HIC no tuvo respuesta vasodilatadora. Al agregar L-NAME al estímulo de vasodilatación (pD₂ HIC: 5,10 ± 1,96 vs pD₂ NC: 7,20 ± 0,38) o L-NAME+Indometacina (pD₂ HIC: 8,81 ± 1,32 vs pD₂ NC: 8,83 ± 0,28), la sensibilidad no presentó diferencias entre ambos grupos. En contraste, la vasodilatación máxima al agregar L-NAME (R_{max} HIC: 3,15% ± 4,15 vs R_{max} NC: 42,84% ± 6,81) y L-NAME+Indometacina (R_{max} HIC: 12,51% ± 5,26 vs R_{max} NC: 46,45% ± 4,17) fue menor en ambos casos en el grupo hipóxico (Fig. 10). Se observaron una disminución del áreas bajo la curva en la comparación de Metacolina de un 39% ± 15,29, Pese a esto, no se encontraron diferencias al comprar del % de vasodilatación independiente de NO.

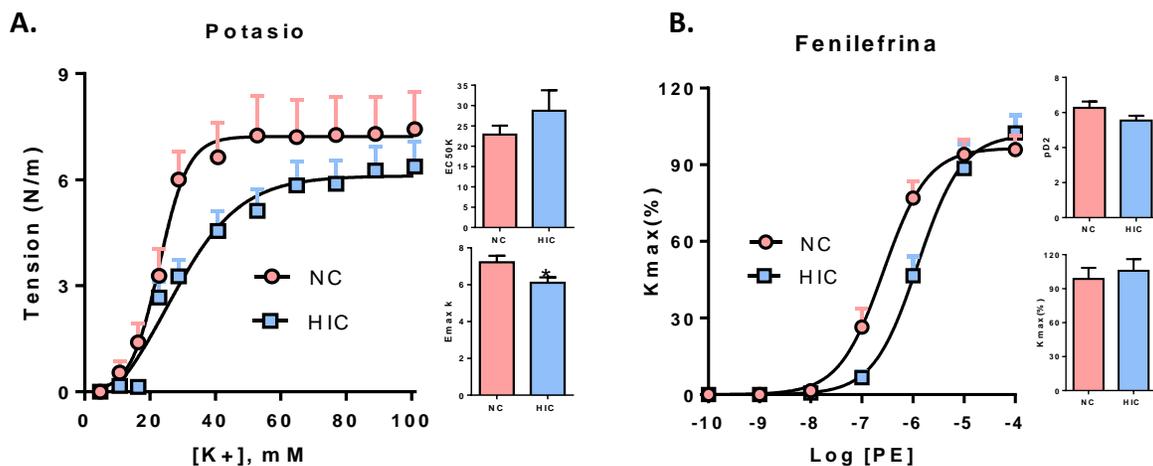


Figura 9. Función vasoconstrictora en arterias femorales. La vasoconstricción fue inducida por (A) Potasio (K⁺) y (B) Fenilefrina (PE). Datos expresados en promedios ± ESM, la respuesta máxima se expresa en E_{max} y K_{max}, la sensibilidad es expresada por EC₅₀ y pD₂, respectivamente. Diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) = * HIC vs NC (n= HIC:6, NC:6).

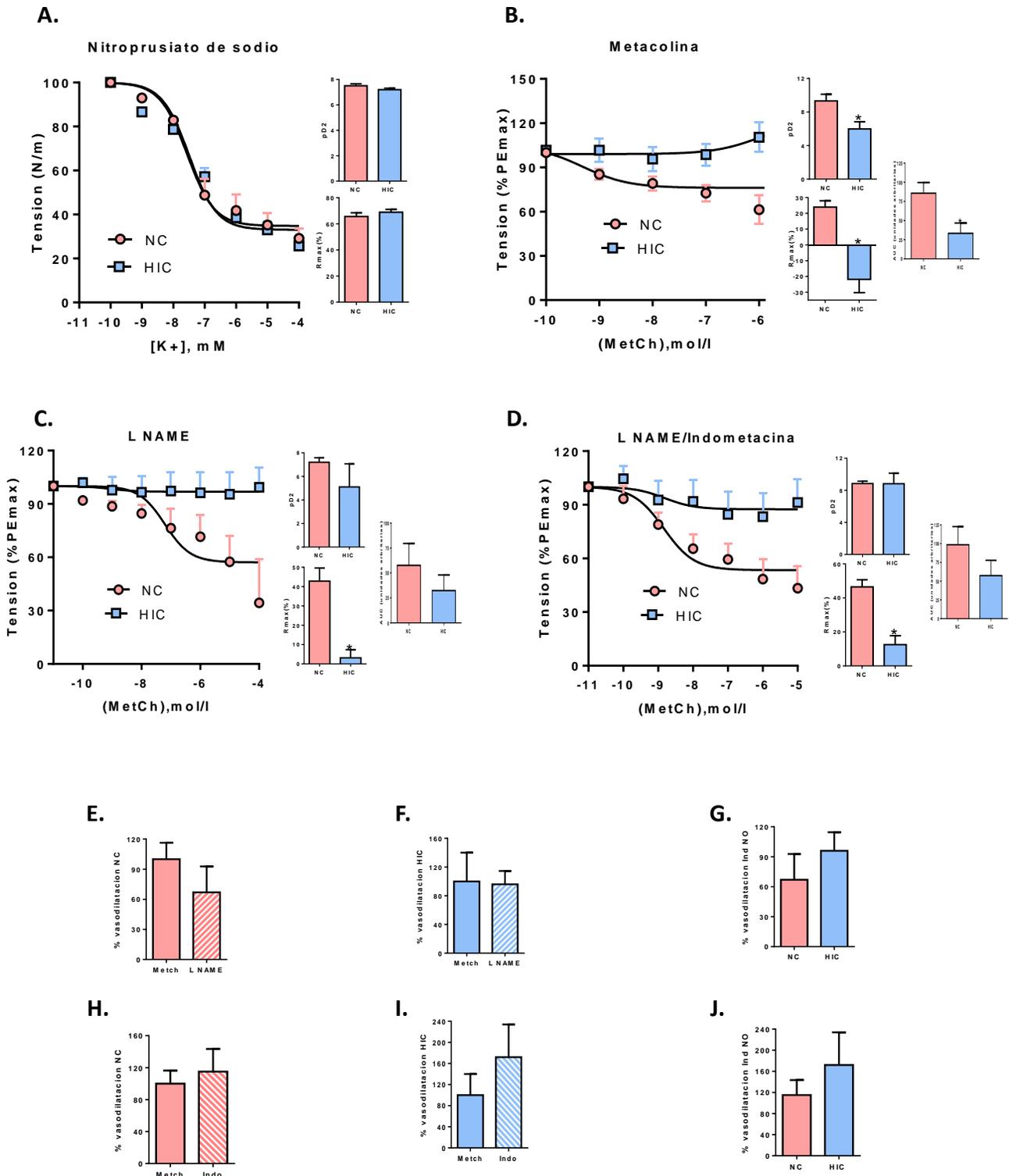


Figura 10. Función vasodilatadora en arterias femorales. La vasodilatación fue inducida por SNP, Metacolina, Metacolina + L-NAME y Metacolina + L-NAME /Indometacina. Los datos son expresados en promedios \pm ESM, la sensibilidad expresada por pD2 y vasodilatación máxima en Rmax. Área bajo la curva (AUC) medido en unidades arbitrarias la sensibilidad expresada por pD2 y vasodilatación máxima en Rmax. **(A)** SNP, **(B)** Metacolina, **(C)** bloqueo L-NAME, **(D)** bloqueo L-NAME/indometacina, **(E)** porcentaje de vasodilatación NA sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo, **(F)** porcentaje de vasodilatación HIC sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo L-NAME, **(G)** porcentaje de vasodilatación independiente de NO **(H)** porcentaje de vasodilatación NC sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo (L-NAME/Indometacina), **(I)** porcentaje de vasodilatación HIC sin bloqueo de L-NAME y con bloqueo (L-NAME), **(J)** porcentaje de vasodilatación bloqueo (L-NAME/Indometacina) NC v/s HIC. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIC vs NC (n= HIC:6, NC:6).

3.3. Capacidad antioxidante y marcadores de estrés oxidativo

Grupos agudos

Las enzimas antioxidantes SOD y GSH-PX presentaron un aumento de 32,68% y 38,19%, respectivamente, en el Grupo HIA en relación al grupo NA (Fig. 11). En contraste, la expresión de CAT fue similar en ambos grupos. A la vez, se observó una disminución de 4-HNE en un 56,75% en HIA respecto a NA (Fig. 12), con expresión similar de NT entre ambos grupos. Por otro lado, al evaluar la actividad enzimática tanto SOD, GSH-PX y CAT se observó un aumento de 53,57%, 141,94% y 32,76%, respectivamente en el Grupo HIA en relación al grupo NA (Fig. 13). Por otro lado, se observó un aumento del 49,11% en la expresión de HIF 2 α en HIA. Sin embargo, no se observan diferencias en los niveles de HIF-1 α , al comparar el grupo HIA con NA (Fig. 14).

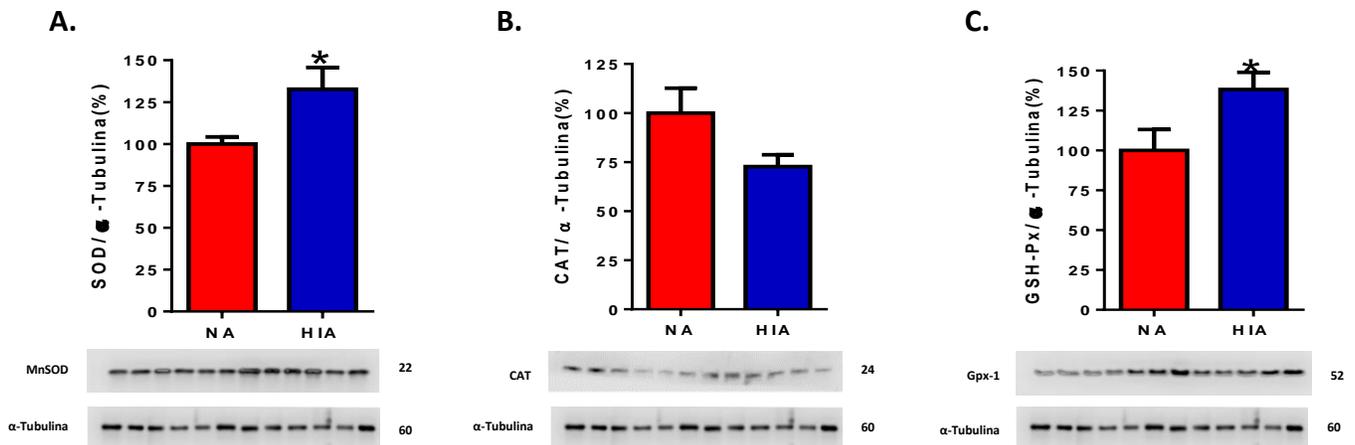


Figura 11. Capacidad antioxidante. Los datos están expresados en promedios \pm ESM, porcentajes (%) en relación al valor del grupo control. Cuantificación a través de western blot de (A) Superóxido dismutasa (SOD), (B) Catalasa (CAT), y (C) Glutatión peroxidasa (GSH-PX). Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6).

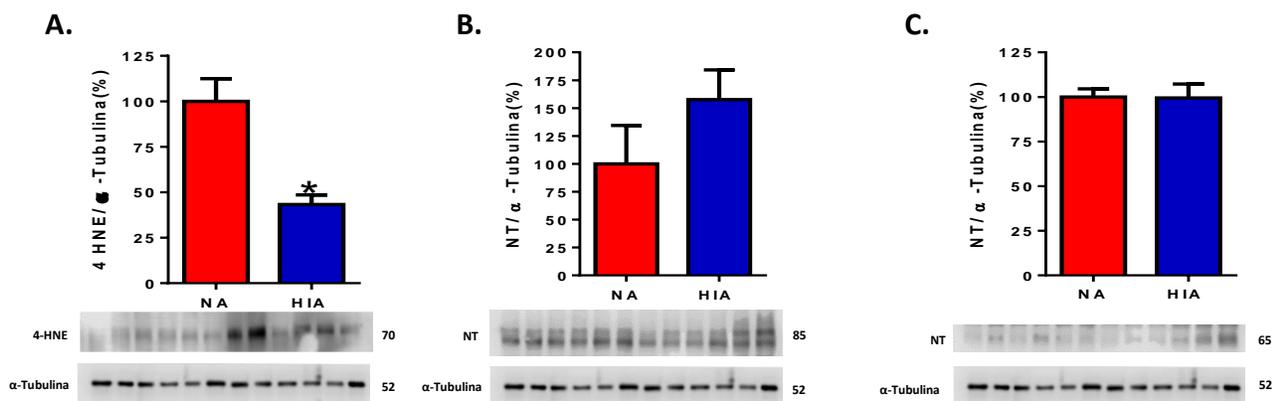


Figura 12. Marcadores de estrés oxidativo. Niveles en Corazón cuantificado a través de western blot (A) 4 hidroxinonal (4HNE), (C y D) Nitrorosina (NT). Los datos están expresados en promedios \pm ESM, porcentajes (%) en relación al valor del grupo control. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6).

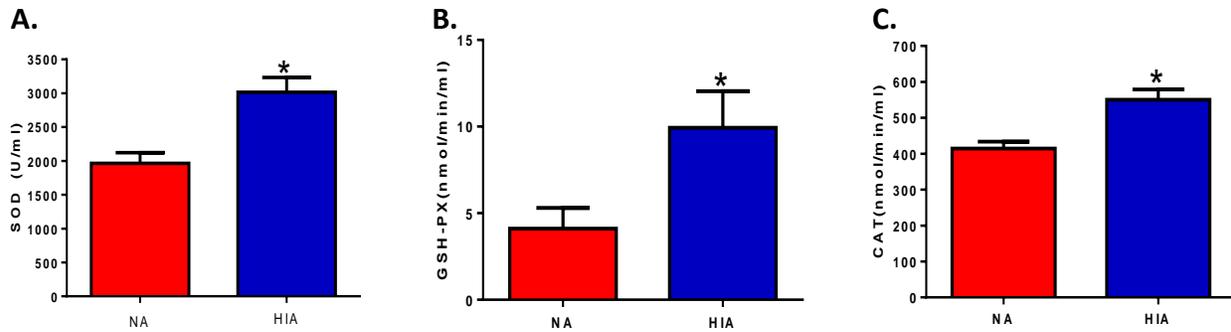


Figura 13. Actividad enzimática. Medición realizada por método de Elisa, (A) Superóxido dismutasa (SOD), (B) Glutación peroxidasa (GSH-PX), (C) Catalasa (CAT). Los datos están expresados en promedios \pm ESM. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6).

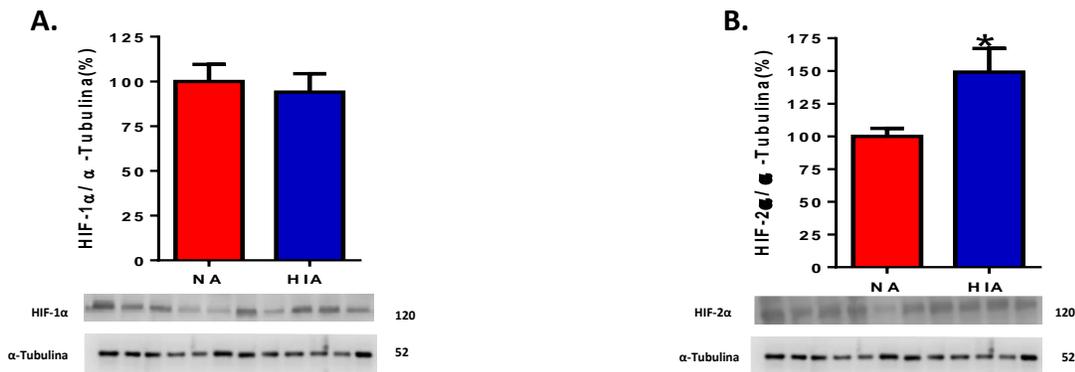


Figura 14. Expresión de factor inducible por Hipoxia (HIF). Expresión proteica a través de Western blot de (A) HIF 1α, y (B) HIF 2α. Los datos están expresados en promedios \pm ESM, porcentajes (%) en relación al valor del grupo control. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6).

Grupos crónicos

Entre los grupos crónicos no se encontraron diferencias en la expresión enzimática de SOD, GSH-PX y CAT (Fig. 15). En contraste, la actividad enzimática presentó una disminución en SOD de 51,65% en HIC, sin cambios en las actividades enzimáticas de CAT y GSH-PX (Fig. 16). 4-HNE presentó una disminución de 81,28% en HIC, sin diferencias en NT con respecto al control (Fig. 17). De la misma manera, no se encontraron diferencias significativas en la expresión de HIF 1α y HIF 2α, al comparar el grupo HIC con NC (Fig. 18).

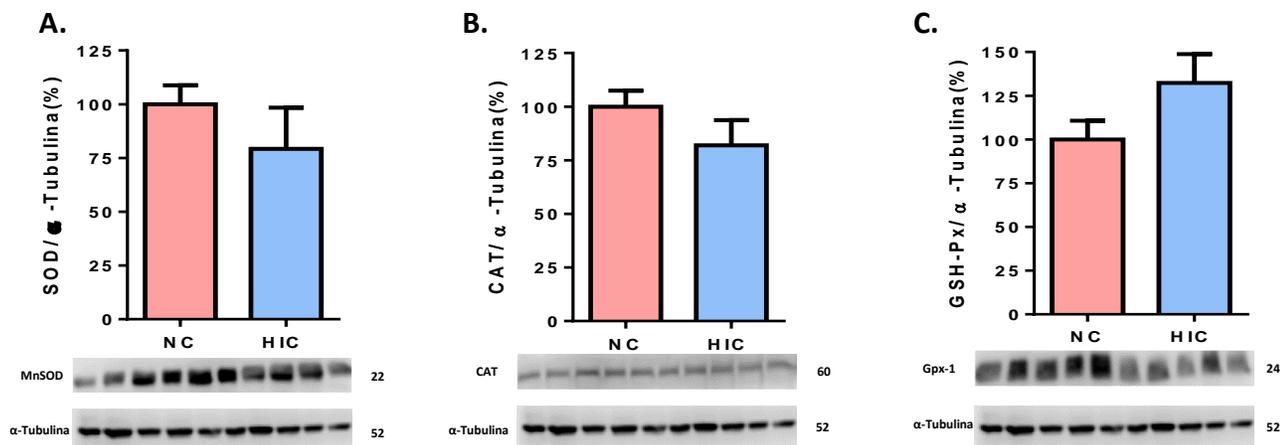


Figura 15. Capacidad antioxidante. Los datos están expresados en promedios \pm ESM, porcentajes (%) en relación al valor del grupo control. Cuantificación a través de western blot **(A)** Superóxido dismutasa (SOD), **(B)** Catalasa (CAT), y **(C)** Glutatión peroxidasa (GSH-PX). Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIC vs NC (n= HIC:5, NC:5).

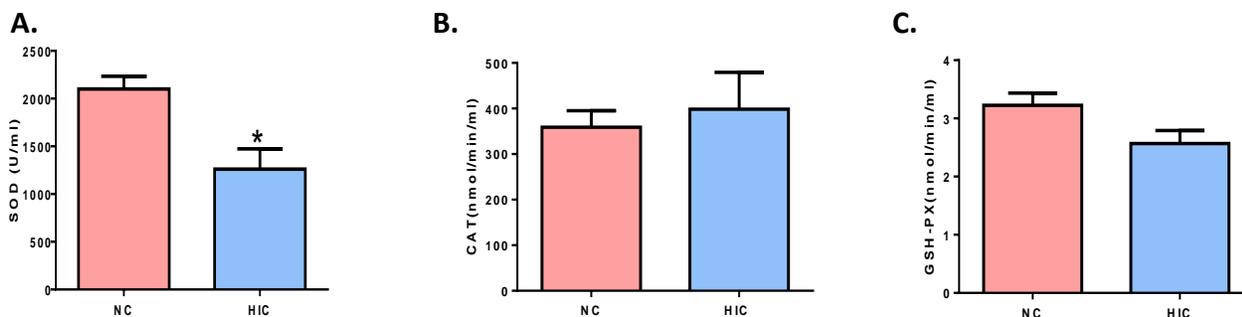


Figura 16. Actividad enzimática antioxidante. **(A)** Superóxido dismutasa (SOD), **(B)** Catalasa (CAT), y **(C)** glutatión peroxidasa (GSH-PX). Los datos están expresados en promedios \pm ESM. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIC vs NC (n= HIC:5, NC:5).

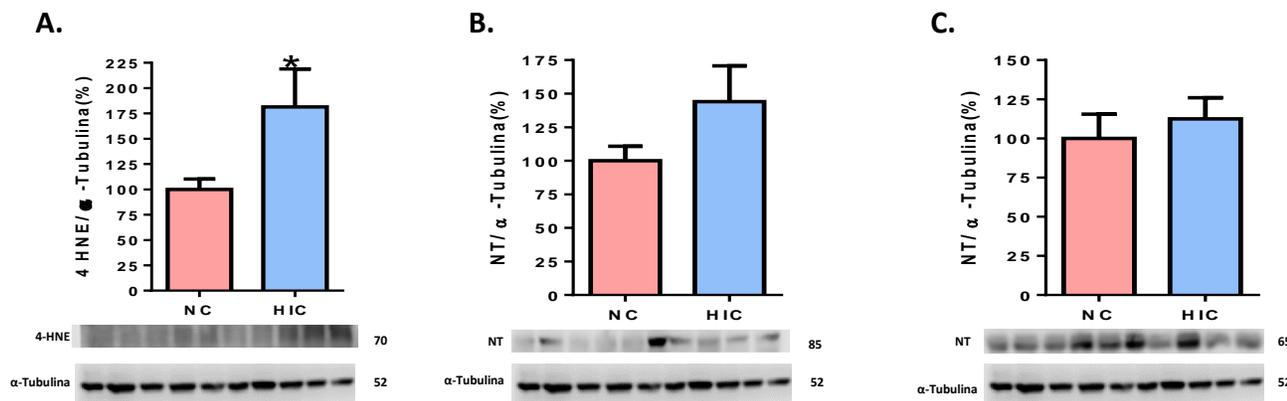


Figura 17. Marcadores de estrés oxidativo. Estrés oxidativo en corazón cuantificado a través de Western blot de **(A)** 4 hidroxinonenal (4HNE) y **(B,C)** nitrotirosina (NT). Los datos están expresados en promedios \pm ESM, porcentajes (%) en relación al valor del grupo control. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIC vs NC (n= HIC:5, NC:5).

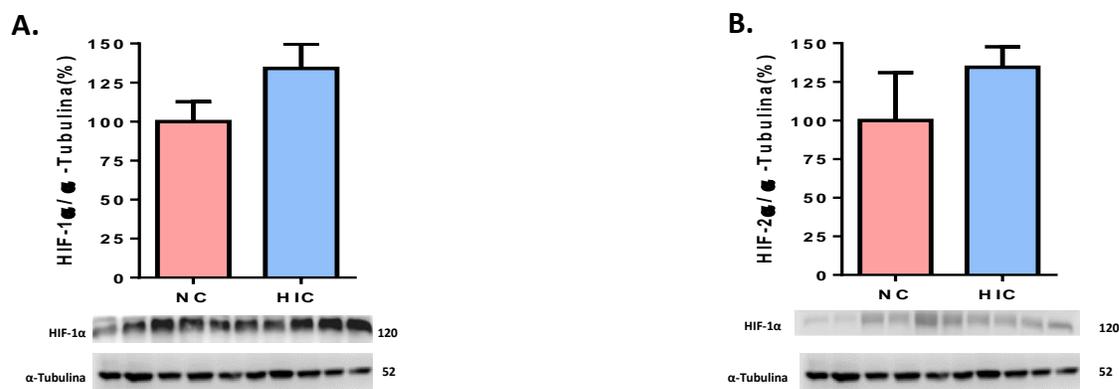


Figura 18. Expresión de factor inducible por hipoxia. (A) HIF 1 α , y (B) HIF 2 α , cuantificado a través de Western blot. Los datos están expresados en promedios \pm ESM, porcentajes (%) en relación al valor del grupo control. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIC vs NC (n= HIC:5, NC:5).

3.4. Fuentes productoras de ERO

Grupos agudos

La producción del $\bullet O_2^-$ por NADPH oxidasa fue similar entre los grupos. En contraste, la generación mitocondrial de $\bullet O_2^-$ fue un 25,80% mayor en HIA en comparación con los animales NA (Fig. 19).

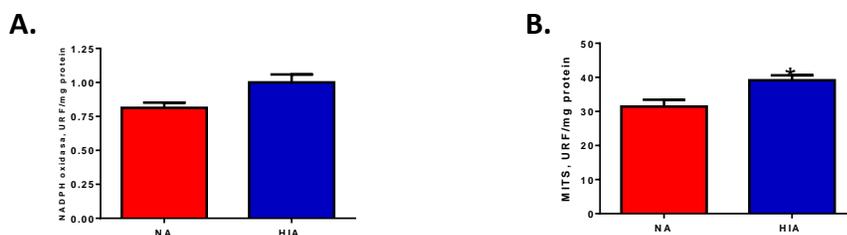


Figura 19. Generación de especies reactivas de oxígeno. Producción de especies de oxígeno reactivo (ERO) de (A) nicotinadina adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), y (B) de fuente mitocondrial (MITS) en tejido cardiaco de ratas. Los datos se expresan en promedios \pm ESM. Diferencias significativas ($P \leq 0,05$): * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6).

Grupos crónicos

La producción de $\bullet O_2^-$ por NADPH oxidasa fue 23,74% mayor en HIC. Por otro lado, la generación mitocondrial de $\bullet O_2^-$ fue 72,96% mayor al comparar HIC con NC (Fig. 20).

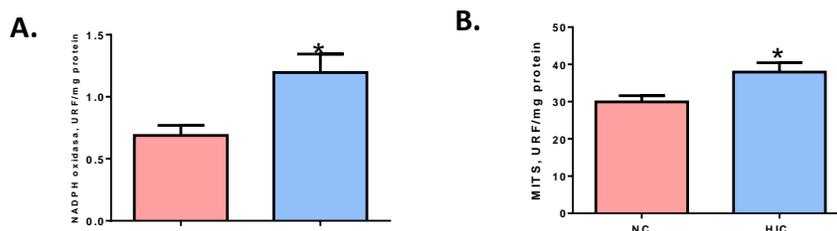


Figura 20. Generación de especies reactivas de oxígeno. Producción de especies de oxígeno reactivo (ERO) de (A) nicotinadina adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), y (B) de fuente mitocondrial (MITS) en tejido cardiaco de ratas. Los datos se expresan en promedios \pm ESM. Diferencias significativas ($P \leq 0,05$): * HIC vs NC (n= HIC:5, NC:5).

3.5. Histología cardiaca y arterial

Grupos agudos

El área total cardiaca, el área total del ventrículo izquierdo, el área luminal izquierda, la pared libre del ventrículo izquierdo y la sumatorias de áreas del septum+ventrículo izquierdo no presentaron diferencias significativas entre el grupo HIA y el grupo control (Tabla 3). Por otro lado, el área total del ventrículo derecho aumento 25,50% y la pared libre presentó un aumento de 42,10% en HIA en comparación con el grupo control (Tabla 3). Pese a esto, no se encontraron diferencias en el área luminal del ventrículo derecho. A la vez, se analizó la relación entre las áreas de ventrículo derecho y el septum + ventrículo izquierdo, y la relación entre el área del ventrículo derecho y área total del corazón, como indicadores de remodelamiento cardiaco, sin pesquisar diferencias significativas (Fig. 21). En contraste, la densidad de miocardiocitos presentó una disminución en el ventrículo derecho del 22,65%, y se observó además en el segmento septal correspondiente al ventrículo izquierdo una disminución de la densidad de 13,19% al comparar el grupo HIA contra NA (Fig. 22). En el resto de los segmentos cardíacos, la densidad de miocardiocitos fue similar entre grupos.

La arteria aorta no presentó diferencias significativas ni en el diámetro luminal ni al comparar el grosor muscular y adventicia entre HIA y NA. Tampoco se observaron diferencias al analizar la relación entre diámetro externo y el diámetro interno ni en la razón del diámetro externo muscular y diámetro interno (Tabla 4).

Por otro lado, la arteria carótida presentó una disminución del diámetro luminal en 25,60% en HIA en relación al control (Tabla 4). Además, se observó un aumento en el grosor muscular en 22,22% en HIA (Tabla 4), sin diferencias significativas en el espesor de la adventicia. Al analizar la razón del diámetro total en relación al diámetro interno, se observó un aumento en 22,72% en HIA. Sin embargo, la razón del diámetro muscular en relación al diámetro interno fue similar entre grupos (Fig. 23).

La arteria femoral presentó una disminución en el diámetro luminal en 31,94%, el diámetro muscular en 37,20%, el diámetro total en 63,06%, el grosor muscular en 42,85%, el perímetro muscular en 44,64% y el perímetro luminal en 30,97%, en el grupo HIA en relación al grupo control (Tabla 4). Sin embargo, el grosor de la adventicia y la relación DM/DI fue similar entre grupos. En contraste, la relación DT/DI presentó un aumento en el grupo HIA de un 32,90% respecto a NA (Fig. 23). Por otro lado, se observó una disminución en la densidad de células musculares en la arteria femoral de un 25,91% en HIA, sin diferencias significativas en la densidad celular de las arterias aortas y carótidas (Fig. 24).

Tabla 3. Determinaciones histológicas en grupos agudos

	NA	HIA
CT (mm ²)	74,62 ± 3,01	79,07 ± 2,17
LVI (mm ²)	12,52 ± 1,13	9,65 ± 1,17
SVI (mm ²)	57,27 ± 4,22	60,80 ± 1,76
PLI (mm ²)	2,51 ± 0,17	2,69 ± 0,15
VD (mm ²)	13,88 ± 0,41	17,42 ± 0,88*
LVD (mm ²)	5,36 ± 0,60	5,95 ± 0,55
PLVD (mm)	0,94 ± 0,08	1,35 ± 0,09*
DAP (mm)	8,93 ± 0,32	9,11 ± 0,50
DL (mm)	10,42 ± 0,43	10,40 ± 0,63
GS (mm)	2,04 ± 0,13	2,08 ± 0,11

Mediciones morfométricas cardiacas: las áreas fueron medidas en milímetros cuadrados (mm²) mientras que las mediciones longitudinales en milímetros (mm), las variables medidas fueron: Área Cardíaca Total (CT), Área del Lumen Ventriculo Izquierdo (LVI), Área de Septum más área del Ventriculo Izquierdo (SVI), Área del Ventriculo Izquierdo (VI), Pared Libre del Ventriculo Izquierdo (PLI), Área del Ventriculo Derecho (VD), Área Luminal Ventriculo Derecho (LVD), Pared Libre del Ventriculo Derecho (PLVD), Diámetro Antero Posterior (DAP), Diámetro Lateral (DL), Grosor Septum (GS), Los datos están expresados en promedios ± ESM; Diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) = * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6).

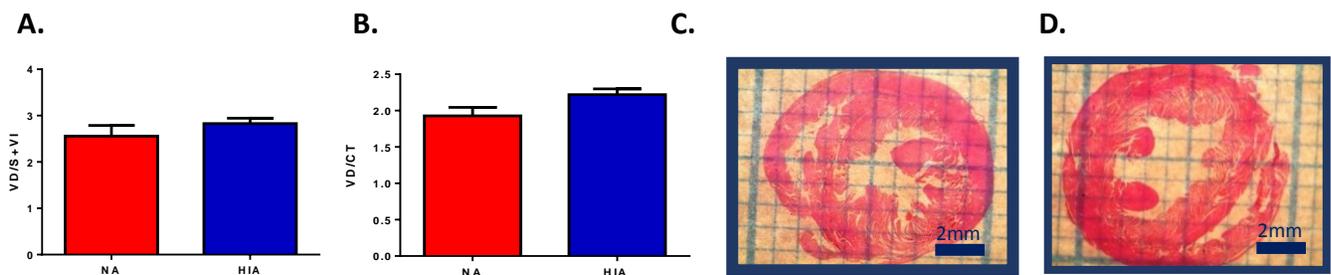


Figura 21. Razón de áreas cardiacas. (A) relación del Área del Ventriculo Derecho (VD) con el Área del Ventriculo Izquierdo más el Área del Septum (S+VI), (B) relación del VD con el Área Cardíaca Total (CT), (C) microfotografía representativa de NA y, (D) microfotografía representativa de HIA. Áreas medidas en milímetro cuadrados (mm²). Los datos están expresados en promedios ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) = * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6).

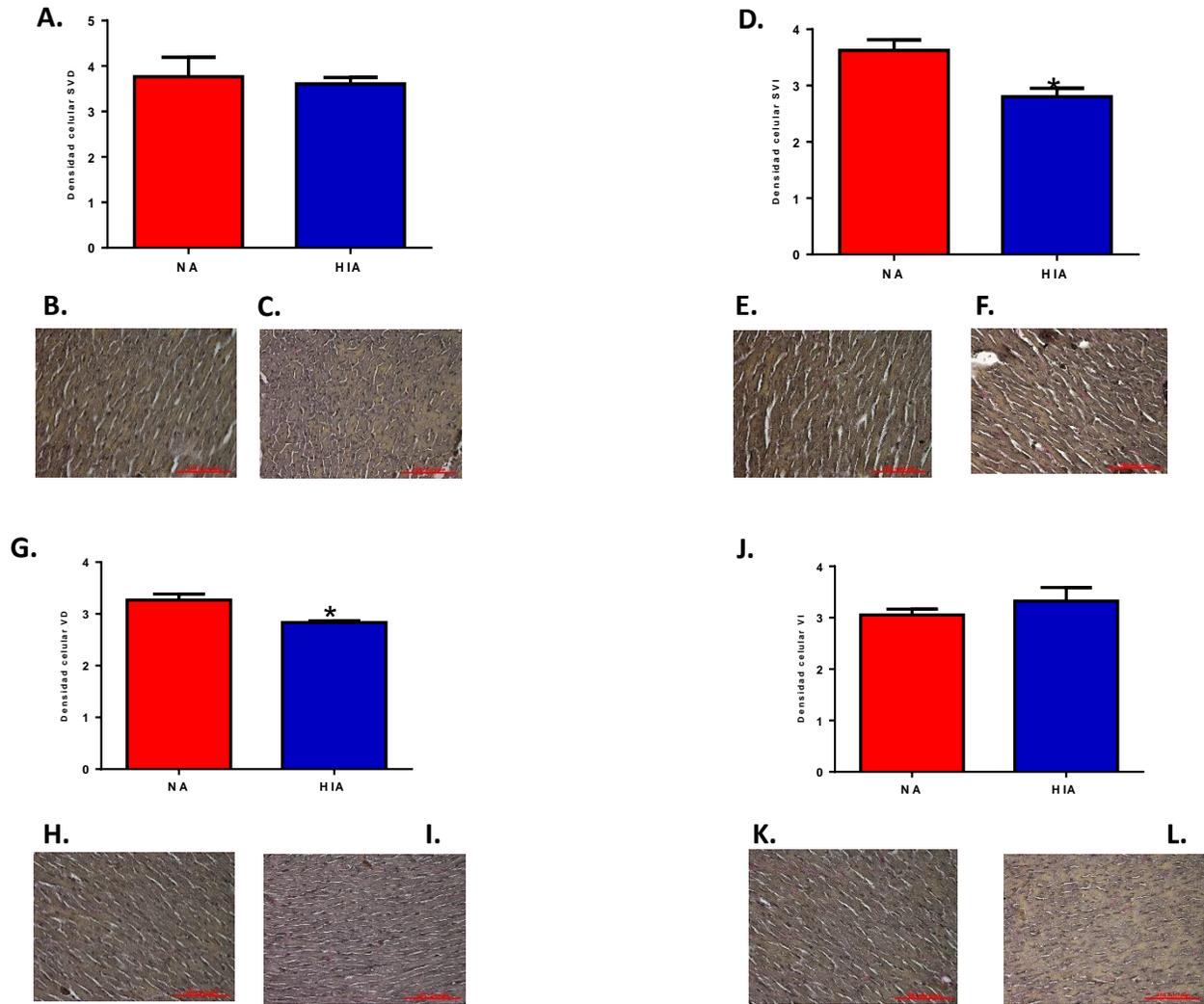
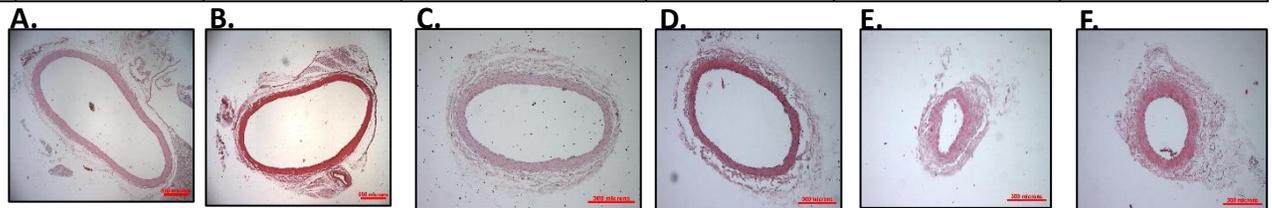


Figura 22. Densidad celular por segmentos cardiacos. Conteo de núcleos en un área de 1000 micrómetros², los segmentos medidos: **(A)** Septum Ventrículo Derecho, imagen representativa **(B)** NA, **(C)** HIA. **(D)** Septum Ventrículo Izquierdo, imágenes representativas **(E)** NA, **(F)** HIA. **(G)** Ventrículo Derecho, imágenes representativas, **(H)** NA, **(I)** HIA. **(J)** Ventrículo Izquierdo, imágenes representativas **(K)** NA, **(L)** HIA. Los datos están expresados en promedios ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIA vs NA ($n = \text{HIA}:6, \text{NA}:6$).

Tabla 4. Determinaciones histológicas de arterias en grupos agudos

	AORTA		CAROTIDA		FEMORAL	
	NA	HIA	NA	HIA	NA	HIA
DI (mm)	2,09 ± 0,06	2,10 ± 0,08	0,82 ± 0,01	0,61 ± 0,10*	0,72 ± 0,04	0,49 ± 0,04*
DM (mm)	2,36 ± 0,07	2,33 ± 0,07	0,91 ± 0,02	0,71 ± 0,13	0,86 ± 0,06	0,54 ± 0,01*
DT (mm)	2,64 ± 0,1	2,52 ± 0,07	1,10 ± 0,02	0,95 ± 0,08	1,11 ± 0,09	0,41 ± 0,03*
GA (mm)	0,29± 0,01	0,29 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,24 ± 0,04	0,24 ± 0,06	0,38 ± 0,02
GM(mm)	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,09 ± 0,005	0,11 ± 0,003*	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,01*
PA (mm)	8,30 ± 0,73	7,91 ± 0,23	3,46 ± 0,07	2,99 ± 0,71	3,49 ± 0,30	3,50 ± 1,13
PM (mm)	7,41 ± 0,22	7,31 ± 0,22	2,87 ± 0,06	2,23 ± 0,58	2,71 ± 0,21	1,50 ± 0,24*
PL (mm)	6,57 ± 0,20	6,59 ± 0,26	2,58 ± 0,06	1,94 ± 0,56	2,26 ± 0,19	1,56 ± 0,14*
CT (mm ²)	3890,93 ± 188,67	3628,25 ± 366,05	729,71 ± 41,12	437,88 ± 267,17	497,28 ± 139,72	1010,61 ± 611,08
AM (mm ²)	2948,61 ± 165,55	3012,23± 351,18	462,46 ± 25,14	284,12 ± 184,65	205,71 ± 53,62	668,63 ± 522,34
AL (mm ²)	2187,37 ± 130,14	2346,74 ± 349,37	337,20 ± 24,16	199,99 ± 140,05	74,58 ± 28,32	471,29 ± 400,19



Mediciones de áreas realizadas en milímetros cuadrados (mm²) y mediciones longitudinales en milímetros (mm), las mediciones realizadas fueron: Diámetro Luminal(DI), Diámetro Muscular externo(DM), Diámetro adventicia(DT), Grosor adventicia(GA), Grosor Muscular(GM), Perímetro adventicia(PA), Perímetro muscular(PM), Perímetro luminal(PL), Área total(AT), Área muscular(AM), Área luminal(AL). Los datos están expresados en promedios ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) = * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6). Bajo la tabla 4 se pueden observar imágenes representativas de los cortes histológicos de las arterias: **(A)** Aorta NA, **(B)** Aorta HIA, **(C)** Carótida NA, **(D)** Carótida HIA, **(E)** Femoral NA, **(F)** Femoral HIA.

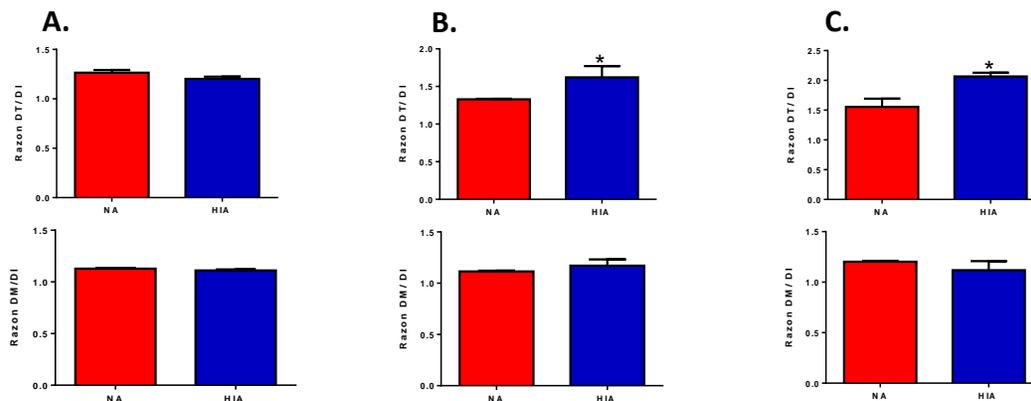


Figura 23. Razón de diámetros en las arterias. Se realizaron relaciones a través de las mediciones histológicas tales como diámetro total de las arterias (DT) con el diámetro interno (DI) y el diámetro muscular (DM) con DI. Imagen **(A)** Aorta, **(B)** Carótida, **(C)** Femoral. Los datos están expresados en promedios ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) = * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6).

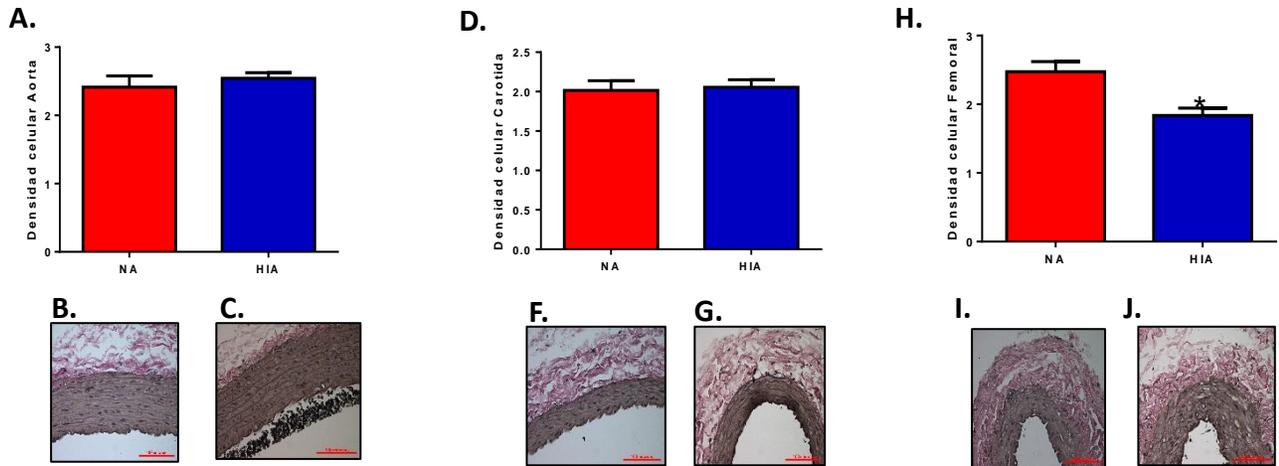


Figura 24. Densidad celular muscular por arteria. Densidad medida a través del conteo de núcleos en un área de 1000 micrómetros²: **(A)** aorta, imagen representativa **(B)** NA, **(C)** HIA; **(D)** carótida, imagen representativa **(F)** NA, **(G)** HIA; **(H)** femoral, imagen representativa, **(I)** NA, **(J)** HIA. Los datos están expresados en promedios ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIA vs NA (n= HIA:6, NA:6).

Grupos crónicos

El área total cardíaca en HIC presentó un aumento de 35,75% en relación a su grupo control. En contraste, no se observaron diferencias en el área luminal del ventrículo izquierdo ni en la pared libre del ventrículo izquierdo. Por otro lado, el ventrículo derecho de HIC presentó un aumento en su área total 78,22%, con un aumento de 69,33% de la pared libre y de 42,55% en su área luminal (Tabla 5). Al analizar la razón del área del ventrículo derecho por área del septum y ventrículo izquierdo, como indicador de remodelamiento cardíaco derecho, se observó un aumento de 33,96% en HIC en relación a NC. También la relación área del ventrículo derecho por área total aumento 29,23% en HIC, al ser comparado con NC (Fig. 25). En la densidad celular muscular se observó una disminución de 23,56% en el ventrículo derecho en relación al grupo control. Asimismo, disminuyó la densidad celular en ventrículo izquierdo de HIC en 23,02%, sin diferencias significativas en el segmento septal del ventrículo izquierdo y derecho (Fig. 26).

En los grupos crónicos, la arteria aorta no presentó diferencias significativas en el diámetro luminal, en el grosor muscular o en adventicia entre HIC y NC (Tabla 6). Tampoco se observaron diferencias al analizar la relación entre DT/DI ni en DM/DI entre estos grupos (Fig. 27).

Por otro lado, en la arteria carótida se observó un aumento en el grosor muscular de un 22,22% y el diámetro muscular en un 13,41% en HIC, sin diferencias significativas en el espesor de la

adventicia ni en el diámetro luminal (Tabla 6). La razón DT/DI no presentó diferencias, mientras que DM/DI aumento en HIC un 11,50% en comparación con NC (Fig. 27). La arteria femoral presentó valores similares en el diámetro luminal, el grosor muscular y adventicia entre HIC y NC (Tabla 7). Asimismo, las relaciones DT/DI y DM/DI fueron similares entre grupos (Fig. 27). Finalmente, el análisis de la densidad celular no mostró diferencias significativas en aorta, carótida y femoral, al comparar HIC con NC (Fig. 28).

Tabla 5. Variables histológicas cardiacas de grupos crónicos.

	NC	HIC
CT(mm ²)	60,36 ± 6,30	81,94 ± 3,76*
LVI(mm ²)	10,86 ± 1,90	11,80 ± 1,24
SVI(mm ²)	46,62 ± 4,43	59,11 ± 3,45
PLI(mm ²)	2,38 ± 0,13	2,57 ± 0,16
VD(mm ²)	12,26 ± 1,76	2,67 ± 0,16*
LVD(mm ²)	4,24 ± 0,70	7,18 ± 0,84*
PLVD(mm)	0,94 ± 0,07	1,34 ± 0,10*
DL(mm)	9,54 ± 0,25	10,86 ± 0,59
DAP(mm)	8,81 ± 0,35	9,73 ± 0,46
GS(mm)	2,05 ± 0,09	2,13 ± 0,20

Las áreas fueron medidas en milímetros cuadrados(mm²) mientras que las mediciones longitudinales en milímetros (mm), las variables medidas fueron: Area Cardíaca Total(CT), Area del Lumen Ventrículo Izquierdo(LVI), Area de Septum más área del Ventrículo Izquierdo(SVI), Area del Ventrículo Izquierdo(VI), Pared Libre del Ventrículo Izquierdo(PLI), Area del Ventrículo Derecho(VD), Area Luminal Ventrículo Derecho(LVD), Pared Libre del Ventrículo Derecho (PLVD), Diámetro Antero Posterior(DAP), Diámetro Lateral (DL), Grosor Septum(GS), Los datos están expresados en promedios ± ESM; Diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) = * HIC vs NC (n= HIC:5, NC:5).

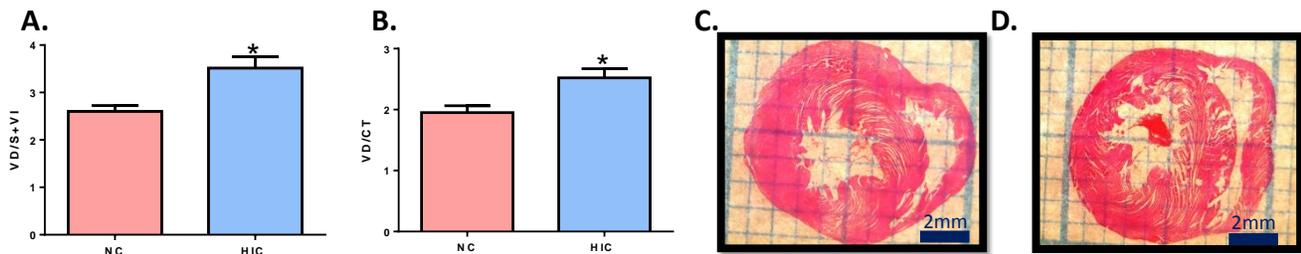


Figura 25. Razón de áreas cardiacas. (A) Relación del Área del Ventrículo Derecho(VD) con el Área del Ventrículo Izquierdo más el Área del Septum (S+VI), (B) relación del VD con el Área Cardíaca Total(CT), (C) microfotografía representativa de NC, y (D) microfotografía representativa de HIC. Áreas medidas en milímetro cuadrados (mm²). Los datos están expresados en promedios ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) = * HIC vs NC (n= HIC:5, NC:5).

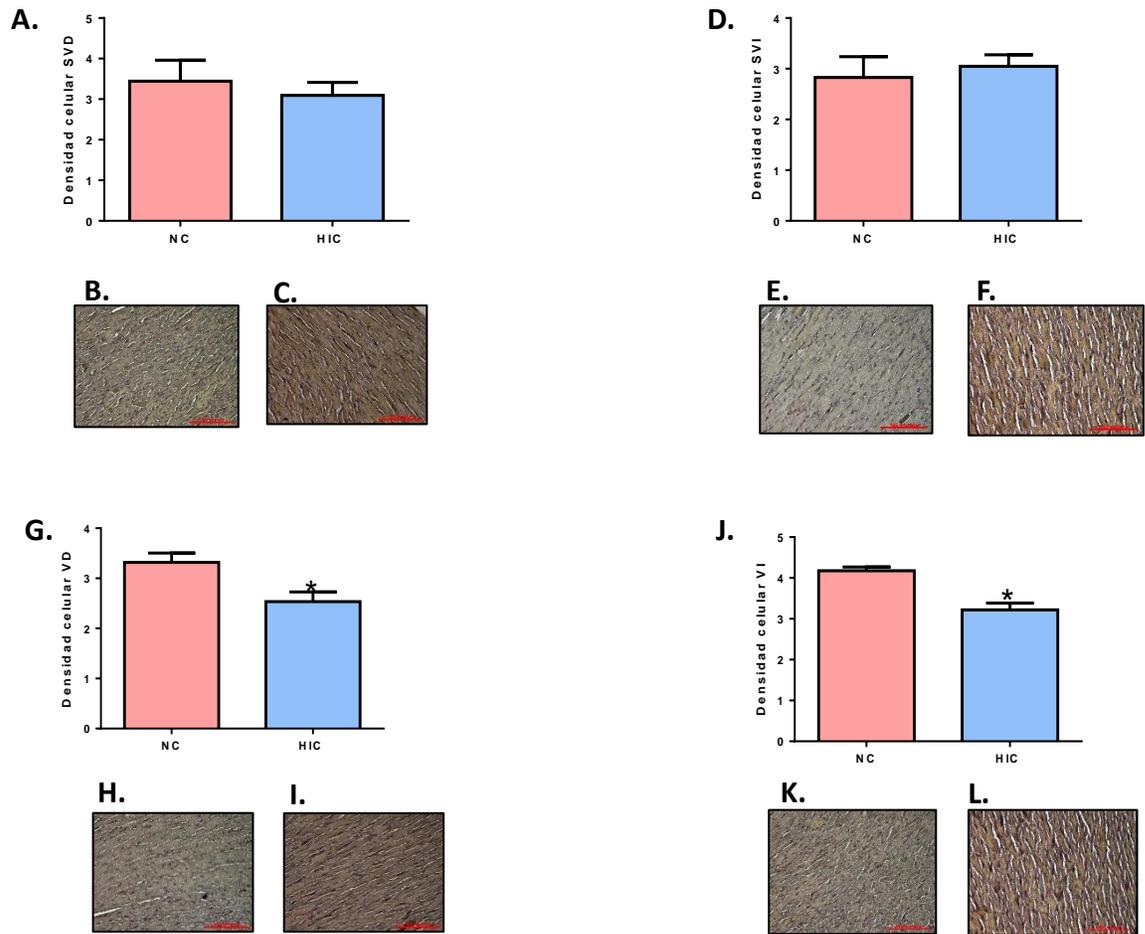
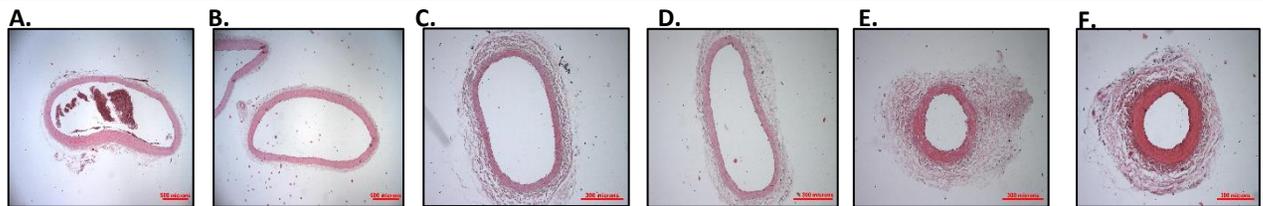


Figura 26. Densidad celular por segmentos cardiacos, fue medido a través del conteo de núcleos en un área de 1000 micrómetros², los segmentos medidos: **(A)** Septum Ventriculo Derecho, imagen representativa **(B)** NC, **(C)** HIC, **(D)** Septum Ventriculo Izquierdo, imágenes representativas **(E)** NC, **(F)** HIC. **(G)** Ventriculo Derecho, imágenes representativas, **(H)** NC, **(I)** HIC, **(J)** Ventriculo Izquierdo, imágenes representativas **(K)** NC, **(L)** HIC. Los datos están expresados en promedios ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIC vs NC (n= HIC:5, NC:5).

Tabla 6. Determinaciones histológicas de arterias en grupos crónicos.

	AORTA		CAROTIDA		FEMORAL	
	NC	HIC	NC	HIC	NC	HIC
DI (mm)	2,04 ± 0,04	1,84 ± 0,09	0,82 ± 0,02	0,82 ± 0,02	0,49 ± 0,06	0,35 ± 0,10
DM(mm)	2,30 ± 0,05	2,11 ± 0,07	0,85 ± 0,005	0,93 ± 0,02*	0,63 ± 0,07	0,57 ± 0,07
DT(mm)	2,61 ± 0,08	2,39 ± 0,07	1,07 ± 0,01	1,12 ± 0,04	1,05 ± 0,08	0,93 ± 0,07
GA(mm)	0,29 ± 0,03	0,28 ± 0,05	0,22 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,42 ± 0,06	0,36 ± 0,04
GM(mm)	0,26 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,09 ± 0,003	0,11 ± 0,003*	0,13 ± 0,01	0,17 ± 0,004
PA(mm)	8,18 ± 2,67	7,53 ± 2,36	4,97 ± 1,56	3,52 ± 1,31	3,32 ± 0,25	2,92 ± 0,24
PM(mm)	7,25 ± 1,67	6,63 ± 2,41	3,79 ± 1,12	2,93 ± 0,84	2,06 ± 0,23	1,79 ± 0,23
PL(mm)	6,42 ± 1,46	5,79 ± 2,82	3,38 ± 1,02	2,58 ± 0,82	1,54 ± 0,21	1,24 ± 0,20
CT(mm ²)	3518,46 ± 149,14	3333,15 ± 230,05	1904,08 ± 1197,30	737,52 ± 82,42	673,14 ± 97,41	536,38 ± 84,58
AM(mm ²)	2692,93 ± 83,55	2638,54 ± 181,70	1097,32 ± 699,30	465,29 ± 49,47	220,69 ± 31,02	197,78 ± 52,67
AL(mm ²)	1899,91 ± 99,24	1926,05 ± 172,14	829,08 ± 534,57	333,97 ± 47,51	100,02 ± 14,96	78,13 ± 28,53



Mediciones de áreas realizadas en milímetros cuadrados (mm²) y mediciones longitudinales en milímetros (mm), las mediciones realizadas fueron: Diámetro Luminal(DI), Diámetro Muscular externo(DM), Diámetro adventicia(DT), Grosor adventicia(GA), Grosor Muscular(GM), Perímetro adventicia(PA), Perímetro muscular(PM), Perímetro luminal(PL), Área total(AT), Área muscular(AM), Área luminal(AL). Los datos están expresados en promedios ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) = * HIC vs NC (n= HIC:4, NC:4). Bajo la tabla 6 se pueden observar imágenes representativas de los cortes histológicos de las arterias: **(A)** Aorta NC, **(B)** Aorta HIC, **(C)** Carótida NC, **(D)** Carótida HIC, **(E)** Femoral NC, **(F)** Femoral HIC.

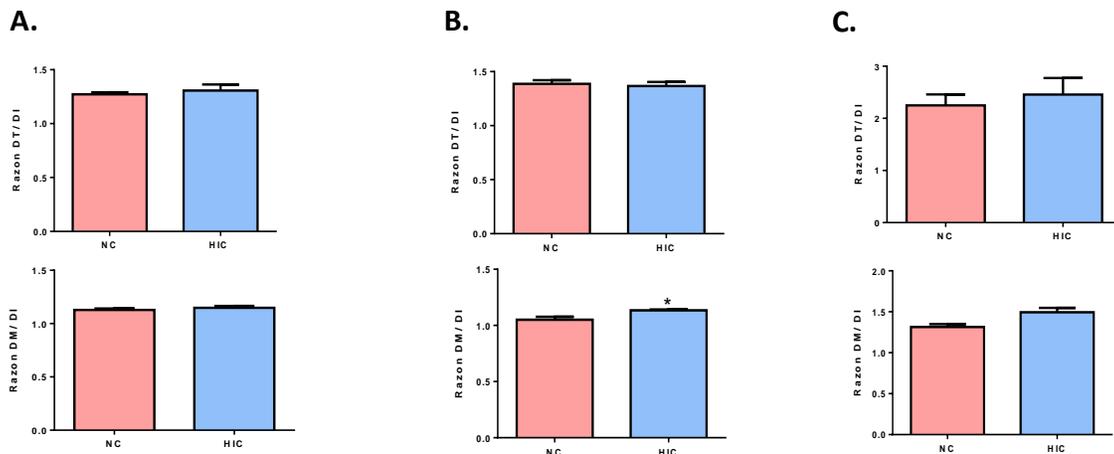


Figura 27. Razones de diámetros de arterias. Se realizaron relaciones a través de las mediciones histológicas tales como diámetro total de las arterias (DT) con el diámetro interno (DI) y el diámetro muscular (DM) con DI. Imagen **(A)** Aorta, **(B)** Carótida, **(C)** Femoral. Los datos están expresados en promedios ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) = * HIC vs NC (n= HIC:4, NC:4).

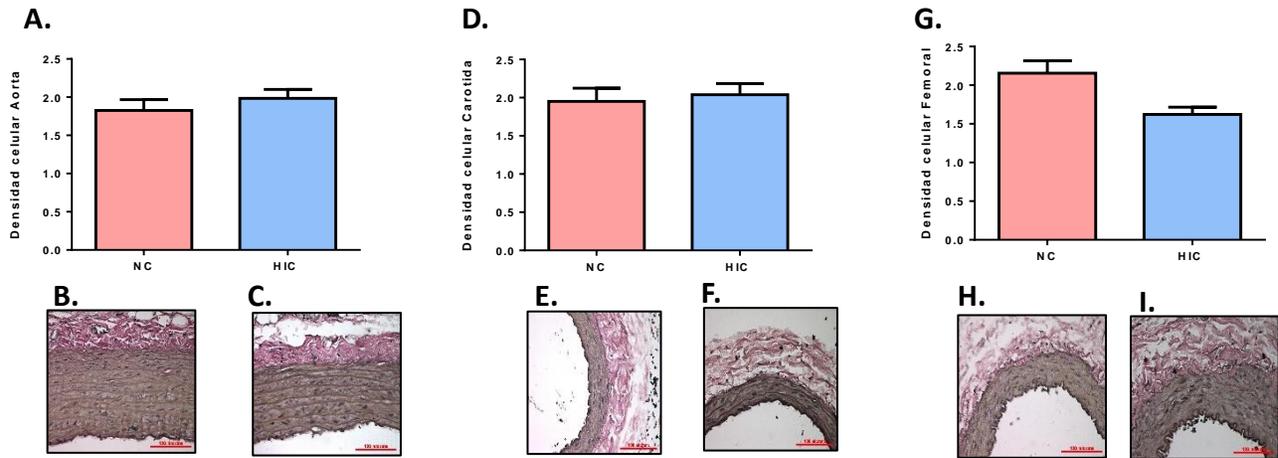


Figura 28. Densidad celular muscular por arteria. Conteo de núcleos en un área de $1000 \mu\text{m}^2$ en **(A)** aorta, imagen representativa **(B)** NA, **(C)** HIA, **(D)** Carótida, imagen representativa **(E)** NA, **(F)** HIA, **(G)** Femoral, imagen representativa, **(H)** NA, **(I)** HIA. Los datos están expresados en promedios \pm ESM. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIC vs NC (n= HIC:4, NC:4).

4. DISCUSIÓN

En nuestro estudio hemos demostrado por primera vez en un modelo en ratas, que la exposición a hipoxia hipobárica determina respuestas diferenciales en la función cardíaca *in vivo*, en la función vascular *ex vivo* y en la expresión de enzimas antioxidantes cardíacas asociadas al tiempo de exposición.

Pocos estudios han demostrado los efectos de la hipobárica intermitente como mecanismo inductor de cardioprotección (1,6). Nuestro modelo confirma un tipo de preconditionamiento inducido por exposiciones repetidas a hipoxia hipobárica, lo cual pareciera producirse ante periodos cortos de exposición, ya que, en periodos prolongados los resultados muestran un grado de disfunción cardíaca y vascular, con remodelamiento patológico (7).

4.1. Efectos funcionales cardíacos agudos

Nuestros hallazgos observados en la función sistólica, destacan una mayor FE, tanto al término del primer ciclo como al término del cuarto ciclo en las ratas HIA. Esta adaptación aparentemente se inicia de manera precoz, incluso desde el primer ciclo de exposición, lo que se asocia con un aumento de la FA y FC. Estudios previos realizados por Boos y cols. (8) concuerdan con nuestros resultados, y destacan que este efecto se observa en todas las formas de inducción de hipoxia hipobárica aguda. Un posible mecanismo inductor de este efecto es el aumento del tono simpático descrito dentro de los procesos de climatización a la hipoxia hipobárica (13), el cual generaría tanto un aumento del cronotropismo como del inotropismo (14). Dentro de estos efectos, el agonismo β -adrenérgico aumenta el segundo mensajero adenosin monofosfato cíclico (AMPc), el cual se une y activa una proteína kinasa dependiente de AMPc (PKA). La PKA tiene diferentes sustratos celulares a nivel miocárdico como blanco de acción fosforilativo: fosforilación de canales de calcio tipo L de la membrana celular y receptores de ryanodina del retículo sarcoplásmico, provocando un aumento de la concentración de Ca^{2+} libre intracelular y la velocidad de relajación ventricular (15). Otros estudios en hipoxia intermitente también han encontrado un efecto cardioprotector asociado a vías similares del preconditionamiento isquémico, mejorando no solo el manejo del calcio y la actividad antioxidante enzimática, sino que también a través del aumento de la vascularización y flujo coronario (49).

Por otro lado, es sabido que la hipoxia produce un aumento del estrés oxidativo (1,50) a su vez un estado pro-oxidante está asociado a diversas formas de patología cardíaca (9,10). En dichas condiciones, la función cardíaca puede ser menos eficiente debido al aumento de estrés oxidativo y a la formación de sustancias reactivas como el peroxinitrito, que inhibe la proteína Serca, alterando la cinética de calcio citosólico (11,12). Pese a los reportes de mayor ocurrencia de estrés oxidativo en hipoxia, en HHI esto parece no ocurrir. Es así como Herrera et al. 2015(16), utilizando un modelo animal de exposición aguda, observaron que en hipobaría intermitente existe una disminución del estrés oxidativo, asociado a un aumento de la capacidad antioxidante. Concordantemente, nuestros hallazgos demuestran un aumento de la producción de ERO, a pesar de que los marcadores de estrés oxidativo se encuentran disminuidos. Estos cambios están asociados con un aumento en la expresión de SOD y GSH-Px, además de un aumento de su actividad enzimática (SOD, GSH-PX Y CAT) (31). Es probable que este efecto esté asociado a la activación del factor nuclear derivado de eritroide 2 (Nrf2) (32), el cual induce la transcripción de enzimas de respuesta antioxidante, lo que aumentaría la capacidad antioxidante (enzimática y no enzimática) de forma compensatoria frente a un aumento de ERO (33). Además, el factor inducible por hipoxia (HIF) ha sido asociado a la estimulación de transcripción de genes relacionados con adaptación a la hipoxia (34). Sin embargo, en nuestro trabajo, no encontramos diferencias significativas en los niveles de HIF-1 α , luego de comparar su expresión en ratas HIA y NA.

Una explicación a esto es que, dependiendo de la intensidad y duración de la hipoxia, HIF-1 α podría presentar una tendencia a la disminución, y un aumento de HIF-2 α quien comandaría el estímulo de transcripción de los elementos adaptativos (35). Por otro lado, estudios realizados por Scortegagna et al 2003 (51), han observado una relación directa de la capacidad antioxidante enzimática y la expresión de HIF2 α . Concordantemente con estos resultados, observamos que HIF 2 α en el grupo agudo se encuentra aumentado, lo que explicaría la mayor capacidad defensiva ante ERO, generado por el aumento en el estímulo transcripcional de enzimas antioxidantes. Esto podría ser la causa del aumento del FE y FA en la exposición aguda. Ya que una disminución del estrés oxidativo, proporcionaría una mayor disponibilidad de calcio en el citoplasma que se une a la troponina C, encontrando una mayor cantidad de sitios de unión actina-miosina. Esta condición mejora la contractibilidad del cardiomiocito, en cada ciclo contráctil subsecuente, concordando con un efecto preconditionante, atenuando el daño miocárdico luego de una injuria mayor.

4.2. Efectos estructurales cardiacos agudos

Al analizar la estructura cardíaca por ecocardiografía de superficie, destaca al término del 4^{to} ciclo la disminución al diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole. Este hallazgo llama la atención ya que la capacidad contráctil del corazón no estaría aparentemente relacionada a la Ley de Starling (16), ya que esta última relaciona la longitud de los miofilamentos y su sensibilidad a los iones de Ca^{2+} , a una mayor sensibilidad al calcio, es posible la realización de más puentes de actina y miosina, lo que generará una mayor fuerza en la contracción cardíaca (52).

Concordantemente con el análisis histológico no se observaron modificaciones en la pared libre del ventrículo izquierdo ni en su área total. Por lo cual, creemos que la función sistólica se encuentra aumentada en el ventrículo izquierdo de las ratas expuestas a HIA en comparación con NA, por un aumento neto de la contractibilidad del cardiomiocito (17). Este efecto de carácter cardioprotector podría deberse al aumento de la capacidad antioxidante y eventualmente un efecto catecolaminérgico. Por otro lado, el ventrículo derecho presenta un aumento del área total, dependiente de un aumento de grosor de la pared libre. Además, encontramos una disminución de la densidad celular, es decir una hipertrofia miocárdica, probablemente por un aumento de la post carga de ventrículo derecho (53,54), que tal como se describe en hipoxia aguda sería generada por un aumento de la resistencia vascular pulmonar (55,56). Esta vasoconstricción puede llevar incluso a la generación de hipertensión pulmonar, y que con el tiempo induce remodelación de los vasos favoreciendo la persistencia de la hipertensión pulmonar. Este hallazgo podría explicar la disminución del diámetro interno del ventrículo izquierdo en diástole encontrado al término del 4^{to} ciclo, siendo esta disminución no una alteración intrínseca del ventrículo izquierdo, sino más bien un efecto de masa provocado por la remodelación compensatoria del ventrículo derecho. Ante nuestros resultados suponemos que esta modificación compensatoria es de carácter fisiológico dado por una hipertrofia de los miocardiocitos, tal como ocurre en un deportista de alto rendimiento asociado al aumento de la postcarga del ventrículo izquierdo (57).

4.3. Efectos funcionales cardiacos crónicos

La función sistólica del ventrículo izquierdo en HIC no presento diferencias respecto al control, no obstante, si se observó un aumento persistente de la frecuencia cardiaca, que podría ser un mecanismo para mantener el gasto cardiaco. Este mecanismo adaptativo es encontrado en otros estudios tales como Klausen et al 1966 (58) quienes observaron que el gasto cardiaco en reposo luego de una exposición prolongada a hipoxia regresaba casi a los valores del nivel del mar, pero con una frecuencia cardíaca persistentemente elevada y un volumen sistólico menor. Una razón para esto es un aumento en la actividad del sistema nervioso simpático junto con la disminución de la actividad parasimpática, siendo predominante esta última (59).

4.4. Efectos estructurales cardiacos crónicos

Nuestros hallazgos destacan un aumento del área cardiaca total en HIC, a expensas de aumento del ventrículo derecho tanto su estructura mural como el área luminal, es decir una cardiomegalia mixta (60), fenómeno encontrado en múltiples trabajos lo cual se asocia a una disminución de la función sistólica (60). Además, observamos una disminución de la densidad de los miocardiocitos, ambos fenómenos podrían estar en relación a una remodelación patológica del corazón (57). Esta remodelación se genera por la persistencia de la sobrecarga de presión en el ventrículo derecho, que si es mantenido llevará a una insuficiencia cardiaca global (53,54). Por lo tanto, es posible plantear que la disminución encontrada en otros trabajos del volumen de eyección, no está sólo asociado al desequilibrio del estímulo parasimpático y simpático, sino también a una disminución de la contractibilidad cardiaca, dado por una remodelación patológica. Otra causa probable es el aumento del estrés oxidativo. Se ha determinado que el aumento del estrés oxidativo es un factor lesivo a nivel celular (28), que puede estar determinado por un aumento de la generación de ERO y/o por la disminución de la capacidad antioxidante. En nuestros resultados los marcadores de estrés oxidativo se encuentran aumentados, al igual que otros estudios que mostraron un aumento de la lipoperoxidacion en HHI a nivel cardiaca, en asociación a la prolongación del estímulo (61). Coincidentemente observamos un aumento de la producción de ERO, pero además una falta de compensación de la capacidad defensiva enzimática, que generó un descenso en la actividad de SOD. Diversos grupos han observado esto, tal es el caso de Sam et al 2005 (62), quienes estudiaron el estrés oxidativo en muestras de corazones humanos con insuficiencia cardiaca dilatada, destacando

una disminución de la actividad de SOD, al igual que en nuestro estudio. Por otra parte, Castro et al 2003 (63) observaron una relación inversa entre el aumento del malondialdehído y la FE y capacidad ante el ejercicio. Por lo tanto, las ERO estarían generando una alteración cardiovascular funcional.

Existen diversos estudios que han evaluado los efectos del estrés oxidativo en el corazón, como se mencionó anteriormente la alteración de las concentraciones de calcio por la inhibición de la proteína Serca (26) parece ser una buena explicación. Además, Fuang Yuang et al 2007 (64) en estudios realizados en HHI observaron que los efectos cardioprotectores están asociados a la disminución de estrés de retículo endoplasmático. Otros estudios han relacionado el aumento del estrés oxidativo con el aumento del estrés del retículo endoplasmático, entendiendo esta última como el estado donde la capacidad de plegamiento proteico se ve alterada (65). Ante este estrés se genera la respuesta a proteína malplegada, mecanismo que busca eliminar las proteínas desplegadas o mal plegadas, evitando la acumulación. Si el estrés es demasiado severo, la capacidad de estos mecanismos de degradación es sobrepasado llevando a la acumulación de proteínas, generando acumulación de proteínas mal plegadas. Esto llevará a una alteración del funcionamiento celular y finalmente la apoptosis, fenómeno que cobra importancia en diversas enfermedades entre las que destaca la insuficiencia cardíaca (66).

Por lo tanto, creemos que en HIC los parámetros funcionales no tienden a la normalización sino más bien están en franco deterioro.

4.5. Efectos funcionales vasculares agudos

La función vasoconstrictora en las arterias carótidas y femorales de HIA se ve aumentada, efectos similares se han descrito por aumento del área de músculo liso en otros estudios (18). Si bien es cierto, esto es concordante con hallazgos previos, en los cuales los mayores niveles de catecolaminas y serotonina en hipoxia generan un efecto de remodelación, resulta interesante observar que este efecto se encuentra incluso en tiempos cortos de exposición a hipoxia que probablemente este sería uno de los cambios adaptativos que induce un aumento de la resistencia vascular periférica (19). Según nuestros resultados, esto pareciese ser cierto a nivel de la arteria carótida.

La vasodilatación independiente de endotelio se evaluó a través de SNP, un dador de óxido nítrico (20), y la dependiente de endotelio, a través del estímulo con metacolina sin diferencia

entre los grupos. No obstante, al bloquear la vía del óxido nítrico por L-NAME, (21) y la vía prostanoideas por Indometacina, (22). Esto demuestra que el rol NO y PGI₂ están aumentados en HIA, probablemente compensando algún proceso vasoconstrictor. De hecho, esto también demuestra que otras vías vasodilatadoras como el EDHF o el monóxido de carbono no lograrían compensar este aumento del tono vasoconstrictor (23).

4.6. Efectos estructurales vasculares agudos

Se observó un aumento del grosor muscular en las carótidas, manteniendo sin diferencias el diámetro total, es decir presentó una remodelación eutrófica (67). En contraste, a nivel femoral se observó una disminución del grosor muscular asociado a una disminución de la densidad celular y una disminución del diámetro total, es decir una remodelación hipotrofia (67). Por lo tanto, probablemente el aumento de la capacidad vasocontráctil en las arterias femorales difiere de lo expresado en otros estudios como una hipertrofia compensatoria por el aumento de catecolaminas, sino más bien podría estar asociado al cambio en la expresión de receptores α_1 y mejora en la cinética del calcio (68). Pese a las modificaciones estructurales de los vasos, en ambas vasodilataciones no existen diferencias en la exposición aguda, probablemente dado a la indemnidad de la función endotelial y muscular con pocos ciclos.

4.7. Efectos funcionales vasculares crónicos

Al observar el efecto vasoconstrictor en el grupo HIC, existe una disminución del efecto máximo al estímulo contráctil, tanto en carótidas como en femorales. El estímulo vasoconstrictor simpático a nivel vascular es generado por los receptores alfa 1-adrenérgicos, los que presentan diferentes subtipos (68) asociados a diversas eficiencias en la activación de PKC. PKC, a su vez se asocia a una multiplicidad de acciones dentro de las que destaca la inhibición de la fosfatasa de cadena ligera de miosina (MLCP), y esta a su vez con la vasoconstricción, por lo que una de las posibilidades de la alteración de la contractibilidad podría deberse a una alteración en la concentración de la expresión de los subtipos de receptores alfa adrenérgico. Por otra parte, el estrés del retículo endoplasmático altera el plegamiento proteico y genera una disminución en la capacidad contráctil, resultando interesante que algunos trabajos plantean que la capacidad protectora de la HHI está asociada a la expresión de la proteína quinasa c (64), la que se relaciona con una disminución del estrés del retículo endoplasmático.

Pese a esto, el resultado obtenido en la vasodilatación en femorales HIC se contrapone, observando una vasodilatación similar entre HIC y NC ante el estímulo por SNP. Sin embargo, la capacidad dilatadora disminuye al observar el efecto dependiente de endotelio. Esto podría derivar de la pérdida de la integridad del endotelio, y/o al aumento del estrés oxidativo el cual ha sido observado en hipoxia hipobárica crónica (25). De acuerdo a los datos obtenidos, se puede plantear que el aumento de ERO podría oxidar factores asociados a la función oxidonitrérgica, lo que determinaría el desacoplamiento de la eNOS, disminuyendo la generación de NO y favoreciendo la producción de $\bullet\text{O}_2^-$ y la formación de peroxinitrito (26). Este último factor se ha asociado a la alteración de la cinética del calcio citosólico alterando la contracción de la musculatura lisa. La importancia de la presencia de disfunción endotelial no solo está asociada a la falta de la regulación de flujo sanguíneo adecuado, sino que también está asociada a una disminución, de todos los procesos endoteliales tales como, funciones antitrombóticas (inhibe la adhesión plaquetaria y la coagulación, y regula el sistema fibrinolítico), modula el tránsito de macromoléculas, como las lipoproteínas, y la adhesión de leucocitos (monocitos/linfocitos T) a la pared arterial (3), lo que predispone al aumento de inflamación, la vasoconstricción, y el incremento de la permeabilidad vascular. A la vez, esto facilita el desarrollo de arteriosclerosis, agregación plaquetaria y trombosis, lo que aumenta la morbilidad cardiovascular (57).

4.8. Efectos estructurales vasculares crónicos

A nivel estructural destaca el aumento de la relación del grosor muscular y relación DM/DI en las carótidas, el cual podemos asociar según lo descrito en la literatura a la remodelación vascular provocada por la prolongación del estímulo simpático en hipoxia (24). Pese a esto el efecto vasoconstrictor disminuye, lo que nos lleva a pensar que el crecimiento muscular no necesariamente mejora la contracción muscular. Esta característica es posible encontrarla en la remodelación patológica, donde la calidad de las proteínas generadas está disminuida asociada a un mal plegamiento, ocasionado por el aumento del estrés del retículo endoplasmático, efecto conocido en HHI (65).

4.9. Proyecciones y limitaciones del estudio

A la luz de los resultados, este estudio demuestra que el efecto vascular en respuesta a la hipoxia hipobárica intermitente depende del tiempo de exposición y el territorio vascular (al menos en carótida y femoral).

Dentro de las limitaciones de este estudio se encuentra que el tipo de medición, que según el protocolo de exposición (tanto aguda como crónica) no nos permite analizar los cambios de manera continua, ya que todos son análisis en un momento temporal específico, el examen ecográfico o la disección (4 y/o 12 ciclos), mediciones que fueron realizadas fuera de la cámara, es decir en normoxia. Por otro lado la medición de variables tales como presión sistémica, catecolaminas, gases en sangre arterial y el balance hídrico no fueron realizadas, estas pueden entregar información respecto a los mecanismos adaptativos cardiovasculares y metabólicos, pocos descritos también en este tipo de modelos. Con respecto a las fortalezas, existen muy pocos estudios que hayan investigado la hipoxia hipobárica intermitente, lo cual hace que este tipo de protocolos experimentales sea extremadamente novedoso, aportando nuevos elementos a la discusión bibliográfica disponible. Además la metodología presenta una exposición temporal fácilmente alcanzable para el hombre, integrando también en este, el ciclo circadiano de las ratas, dado a que muchos de los modelos animales presentan exposición a la hipobaría parcial durante las 24 horas de manera que los resultados podrían verse alterados. Si buscamos la equivalencia del tiempo de exposición de la rata con el de un ser humano, podemos relacionarlo con la esperanza de vida de una rata macho Wistar de 3,5 años (69) con la esperanza de vida promedio de 79 años en Chile (70). Según esto, los ciclos escogidos representarían en el grupo considerado agudo una intermitencia total de 2 años, mientras que el grupo crónico presentaría una intermitencia de 6 años. Esto nos lleva a pensar que un trabajador en hipoxia hipobárica intermitente, con más de 6 años de trabajo podría presentar algún grado de insuficiencia cardíaca y disfunción endotelial, difícil de diagnosticar a través de los exámenes médicos de rutina estipulados para estos trabajadores según el Minsal (4). Este es un tema importante para la salud laboral y pública en regiones que existen turnos de trabajo en altura como en el Cordón Andino Chileno (1, 71).

5. CONCLUSIÓN

Por todo a lo anterior concluimos que a nivel cardiaco la hipoxia hipobárica intermitente aguda genera un efecto cardioprotector que mejora la función sistólica del VI. Pese a esto, aparentemente existe un estímulo de sobrecarga de presión en el ventrículo derecho, que puede ser explicado en nuestros resultados por el aumento de la vasoconstricción máxima, la cual llevaría incluso en períodos agudos a la remodelación. La permanencia de la hipoxia en el tiempo acentúa la remodelación ventricular pudiendo derivar en una cardiomegalia excéntrica. Por otro lado, en HIC el ventrículo izquierdo pierde su mejora funcional, presentando también signos de remodelación patológica. A la vez, HIC desencadena efectos diferenciales según el lecho vascular. En la arteria femoral (circulación periférica), disminuyó la capacidad vasodilatadora endotelial, debido probablemente a la disminución de las funciones de NO y PG. En marcado contraste, HIC parece proteger los vasos carotídeos (circulación central), al mejorar la función vasodilatadora. Este efecto fue mediado por mecanismos endoteliales dependientes e independientes y una función mejorada de la vía del NO. En conclusión, HIC induce claramente una disfunción endotelial en las arterias femorales, pero una protección vasodilatadora en las arterias carótidas.

Los diferentes tiempos de exposición no solo generaron cambios funcionales y estructurales, sino que también inducen cambios en expresión proteica de proteínas que regulan la respuesta a hipoxia, así como proteínas relacionadas con el estrés oxidativo.

Falta información que logre caracterizar de manera específica el efecto cardioprotector vs la injuria de la hipoxia hipobárica intermitente a nivel molecular, pero este proyecto presenta información clara de los trastornos funcionales provocados por este estímulo, según la prolongación de la exposición a nivel cardiaco y vascular, presentado como un importante agente causal la ocurrencia de estrés oxidativo. Finalmente, estas alteraciones en la producción de ERO y/o fuentes pro-oxidantes, podrían sustentar la base de una terapia basada en antioxidantes.

6. REFERENCIAS

- 1.- 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. *Pharmacology & Therapeutics*. 2016; 158:1–23.
- 2.- Farias JG, Jimenez D, Osorio J, Zepeda AB, Figueroa CA, Pulgar VM. Acclimatization to chronic intermittent hypoxia in mine workers: a challenge to mountain medicine in Chile. *Biological Research*. 2013; 46(1):59-67
- 3.- Richalet JP, Vargas-Donoso M, Jiménez D, Antezana AM, Hudson C, Cortés G, Osorio J, León A. Chilean Miners Commuting from sea level to 4500 m: a prospective study. *High Altitude Medicine & Biology*. 2002; 2:159-166.
- 4.- Norma técnica N° 157, “Guía Técnica sobre exposición ocupacional a hipobária intermitente crónica por gran altitud”, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile, 2013.
- 5.- Peng YJ, Prabhakar NR. Effect of two paradigms of chronic intermittent hypoxia on carotid body sensory activity. *Journal of Applied Physiology*. 2004; 96(3):1236–124.
- 6.- Richalet JP. Altitude and the cardiovascular system. *Presse Medicale*. 2012; 41(6):638-643.
- 7.- Anderson JD, Honigman B. The Effect of Altitude-Induced Hypoxia on Heart Disease: Do Acute, Intermittent, and Chronic Exposures Provide Cardioprotection? *High Altitude Medicine and Biology*. 2011;12(1):45-55.
- 8.- Boos CJ, O'Hara JP, Mellor A, Hodkinson PD, Tsakirides C, Reeve N, Gallagher L, Green ND, WoodsDR. A Four-Way Comparison of Cardiac Function with Normobaric Normoia, Normobaric Hypoxia, Hypobaric Hypoxia and Genuine High Altitude. *PLoS One*. 2016; 11(4): 11-17
- 9.- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of than cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986; 74(5):1124–1136.
- 10.- Shizukuda Y, Mallet RT, Lee SC, Downey HF. Downey H. Hypoxic preconditioning of ischemic canine myocardium. *Cardiovascular Research*. 1992; 26(5):534–542.
- 11.- Béguin PC, Belaidi E, Godin-Ribuot D, Lévy P, Ribuot C. Intermittent hypoxia-induced delayed cardioprotection is mediated by PKC and triggered by p38 MAP kinase and Erk1/2. *Journal of Molecular Cellular Cardiology*. 2007; 42(2):343–351.
- 12.- Béguin PC, Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Lévy P, Ribuot C. Acute intermittent hypoxia improves rat myocardium tolerance to ischemia. *Journal of Applied Physiology*. 2005; 99(3):1064–1069.

- 13.- Zhou W, Li S, Wan N, Zhang Z, Guo R, Chen B. Effects of various degrees of oxidative stress induced by intermittent hypoxia in rat myocardial tissues. *Respirology*. 2012; 17(5):821-829.
- 14.- Semenza GL. Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology*. 2009; (24):97–106.
- 15.- Castillo RL, Farias JG, Herrera EA, Alvarez PI, Short S, Tapia L, Carrasco-Pozo C, Sotomayor-Zárate R. Effects of Chronic Intermittent Hypoxia and Polyunsaturated Fatty Acids on Infarct Size and Oxidative Stress Markers in Cardiac Ischemia Reperfusion. *Experimental Clinical Cardiology*. 2014; 20(8):3833-3858.
- 16.- Herrera EA, Farías JG, González-Candía A, Short SE, Carrasco-Pozo C, Castillo RL. Ω 3 Supplementation and Intermittent Hypobaric Hypoxia Induce Cardioprotection Enhancing Antioxidant Mechanisms in Adult Rats. *Marine Drugs*. 2015; 3(2): 838-860.
- 17.- Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Molecular and Cellular Biology*. 2003; 23(24): 9361–9374.
- 18.- Kumar H, Choi DK. Hypoxia Inducible Factor Pathway and Physiological Adaptation: ¿A Cell Survival Pathway?. *Mediators Inflammation*. 2015: 584758.
- 19.- Koh MY, Powis G. Passing the baton: the HIF switch. *Trends in Biochemical Sciences*. 2012; 9:364-372.
- 20.- Verges S, Chacaroun S, Godin-Ribuot D, Baillieul S. Hypoxic Conditioning as a New Therapeutic Modality. *Frontiers in Pediatrics*. 2015; 22:3-58.
- 21.- Sunderram J, Androulakis IP. Molecular mechanisms of chronic intermittent hypoxia and hypertension. *Critical Reviews in Biomedical Engineering*. 2012; 40(4):265-278.
- 22.- Munzel T, Sinning C, Post F, Warnholtz A, Schulz E. Pathophysiology, diagnosis and prognostic implications of endothelial dysfunction. *Annals of Medicine*. 2008; 40(3):180–196.
- 23.- Mclaughlin W, Rich S. Pulmonary hypertension. *Current Problems Cardiology*. 2004; 29(10):575-634.
- 24.- Iturriaga R, Moya EA, Del Rio R. Inflammation and oxidative stress during intermittent hypoxia: the impact on chemoreception. *Experimental Physiology*. 2015; 100(2):149–155.
- 25.- Craige SM, Kant S, Keaney JF Jr. Reactive Oxygen Species in Endothelial Function. *Circulation Journal*. 2015; 79(6):1145-1155.
- 26.- Briehl MM. Oxygen in human health from life to death – An approach to teaching redox biology and signaling to graduate and medical students. *Redox Biology*. 2015; 5:124-139.

- 27.-Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. *Redox Biology*. 2013; 1:244-257.
- 28.- Lara-Terán J. Estrés oxidativo, disfunción endotelial y aterosclerosis. *Anales de la Facultad de Medicina Lima*. 2014; 75(4): 351-352
- 29.- Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling. *Nature Review*. 2014; 15(6): 411-421.
- 30.- Flammer AJ, Lüscher TF. Human endothelial dysfunction: EDRFs. *European Journal of Physiology*. 2010; 459(6):1005-1013.
- 31.- Hellsten Y, Nyberg M, Jensen LG, Mortensen SP. Vasodilator interactions in skeletal muscle blood flow regulation. *Journal of Physiology*. 2012; 590(24): 6297–6305.
- 32.- Villar IC, Francis S, Webb A, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone. *Kidney International*. 2006; 70(5): 840–853.
- 33.- Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology*. 2015; 4: 180–183.
- 34.- Benzie IF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*. 1996; 239(1):70-76.
- 35.- Pai P, Lai CJ, Lin CY, Liou YF, Huang CY, Lee SD. Effect of Superoxide Anion Scavenger on Rat Hearts with Chronic Intermittent Hypoxia. *Journal of Applied Physiology*. 2016; 120(8):982-990.
- 36.- Chemaly ER, Hadri L, Zhang S, Kim M, Kohlbrenner E, Sheng J, Liang L, Chen J, K-Raman P, Hajjar RJ, Lebeche D. Long-term in vivo Resistin Overexpression Induces Myocardial Dysfunction and Remodeling in Rats. *Journal of Molecular Cellular Cardiology*. 2011; 51(2): 144–155.
- 37.- van de Weijer T, van Ewijk PA, Zandbergen HR, Slenter JM, Kessels AG, Wildberger JE, Hesselink MK, Schrauwen P, Schrauwen-Hinderling VB, Kooi ME. Geometrical models for cardiac MRI in rodents: comparison of quantification of left ventricular volumes and function by various geometrical models with a full-volume MRI data set in rodents. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 2012; 302(3): 709-715.
- 38.- Martínez-Dolz L, Almenar-Bonet L. Técnicas de imagen en la insuficiencia cardiaca. *Revista Española de Cardiología*. 2006; 6:27-45.

- 39.- Inserte J, Cardona M, Poncelas-Nozal M, Hernando V, Vilarrosa Ú, Aluja D, Parra VM, Sanchis D, Garcia-Dorado D. Studies on the role of apoptosis after transient myocardial ischemia: genetic deletion of the executioner caspases-3 and -7 does not limit infarct size and ventricular remodeling. *Basic Research in Cardiology*. 2016; 111(2):18.
- 40.- Bichara VM, Tazar J, Ventura HO. El ecocardiograma como herramienta para el diagnóstico y la evaluación de los pacientes con insuficiencia cardíaca. *Insuficiencia cardíaca. Ciudad Autónoma de Buenos Aires*. 2010; 5(2):51-58.
- 41.- Marwick-Thomas H. The Role of Echocardiography in Heart Failure. *The Journal of Nuclear Medicine*. 2015; 56(4):31-38.
- 42.-Dokainish H. Left ventricular diastolic function and dysfunction: Central role of echocardiography. *Global Cardiology Science and Practice*. 2015:3
- 43.- Mulvany MJ, Halpern W. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research*. 1977; 41:19-26.
- 44.- 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(2):1-8.
- 45.- 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 hypertensive newborn sheep. *Journal Pineal Research*. 2015; 58(3):362-373.
- 46.- Carrasco-Pozo C, Castillo RL, Beltrán C, Miranda A, Fuentes J, Gotteland M. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: role of NF- κ B and Nrf2. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2015; 27: 289-298.
- 47.- Herrera EA, Riquelme RA, Ebensperger G, Reyes RV, Ulloa CE, Cabello G, Krause BJ, Parer JT, Giussani DA, Llanos AJ. A. Long-term exposure to high-altitude chronic hypoxia during gestation induces neonatal pulmonary hypertension at sea level. *American Journal Physiology*. 2010; 299(6): 1676–1684.
- 48.- Castillo RL, Álvarez PI, Sánchez G. Determinación de biomarcadores de respuesta antioxidante en un modelo de isquemia-reperfusión en el corazón aislado de Rata. *Sociedad de Farmacología de Chile*. 2013; 6(1):45-53.

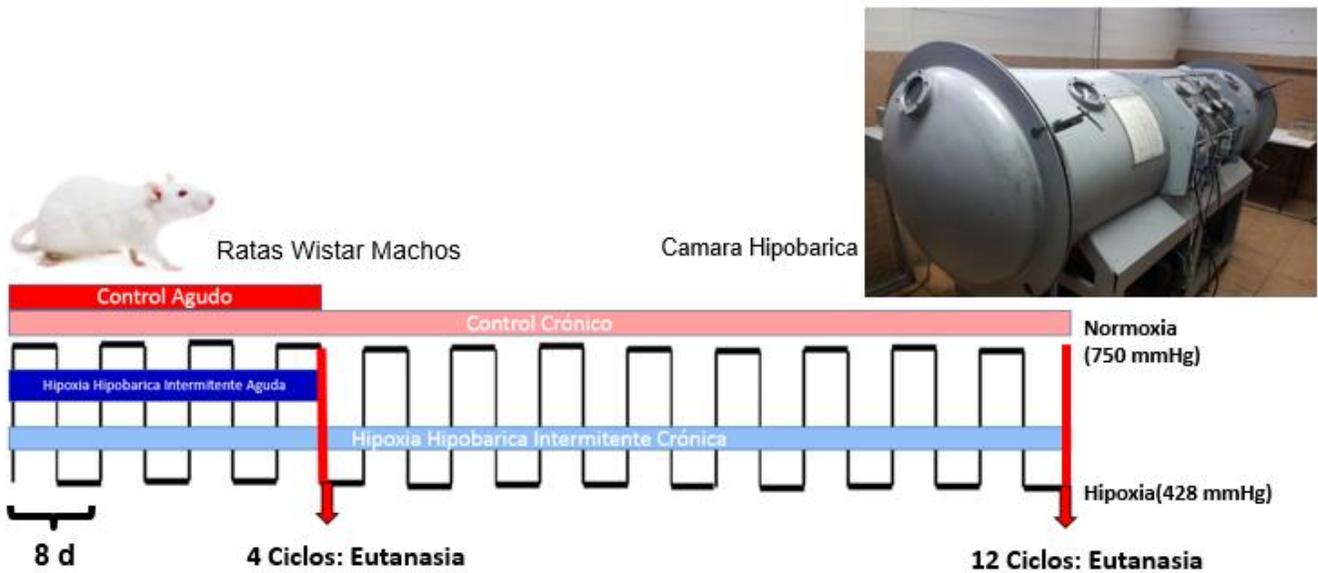
- 49.- Zhong N, Zhang Y, Zhu HF, Wang JC, Fang QZ, Zhou ZN. Myocardial capillary angiogenesis and coronary flow in ischemia tolerance rat by adaptation to intermittent high altitude hypoxia. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2002; 23(4):305-310.
- 50.- Moller P, Risom L, Lundby C, Mikkelsen L, Loft S. Hypoxia and oxidation levels of DNA and lipids in humans and animal experimental models. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. 2008; 60(11):707-723.
- 51.- Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ, Marck BT, Matsumoto AM, Shelton JM, Richardson JA, Bennett MJ, Garcia JA. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*^{-/-} mice. *Nature genetics*. 2003; 35(4):331-40.
- 52.- Sequeira V, van der Velden J. The Frank–Starling Law: a jigsaw of titin proportions. *Biophysical Reviews*. 2017; 9(3): 259–267.
- 53.- da Silva D, Gonçalves Bos D, Van Der Bruggen CE, Kurakula K, Sun XQ, Casali KR, Casali AG, Rol N, Szulcek R, Dos Remedios C, Guignabert C, Tu L, Dorfmüller P, Humbert M, Wijnter PJM, Kuster DWD, van der Velden J, Goumans MJ, Bogaard HJ, Vonk-Noordegraaf A, de Man FS, Handoko ML. Contribution of Impaired Parasympathetic Activity to Right Ventricular Dysfunction and Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2017; 22:43-69.
- 54.- Pinsky MR. The right ventricle: interaction with the pulmonary circulation. *Critical Care*. 2016; 20(1): 266.
- 55.- Ma TT, Wang Y, Zhou XL, Jiang H, Guo R, Jia LN, Chang H, Gao Y, Yao XY, Gao ZM, Pan L. Research on rat models of hypobaric hypoxia-induced pulmonary hypertension. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2015; 19:3723-3730.
- 56.- Penalzoza D, Arias-Stella J. The heart and pulmonary circulation at high altitudes: healthy highlanders and chronic mountain sickness. *Circulation*. 2007; 115(9):1132-1146.
- 57.- Carreño JE, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil JE. Hipertrofia cardiaca: eventos moleculares y celulares. *Revista Española de Cardiología*. 2017; 70(12):1035-1158.
- 58.- Eric Klausen K. Cardiac output in man in rest and work during and after acclimatization to 3,800 m. *Journal of Applied Physiology*. 1966; 21(2):609–616.

- 59.- Hopkins SR, Bogaard HJ, Niizeki K, Yamaya Y, Ziegler MG, Wagner PD. β -adrenergic or parasympathetic inhibition, heart rate and cardiac output during normoxic and acute hypoxic exercise in humans. *Journal of Physiology*. 2003; 550(2):605–616.
- 60.- William H, Gaasch MD, Michael R. Zile MD. Left Ventricular Structural Remodeling in Health and Disease: With Special Emphasis on Volume, Mass, and Geometry. *Journal of the American College of Cardiology*. 2011; 58(17):1733-174.
- 61.- Singh M, Thomas P, Shukla D, Tulsawani R, Saxena S, Bansal A. Effect of Subchronic Hypobaric Hypoxia on Oxidative Stress in Rat Heart. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013; 169(8):2405-2419.
- 62.- Flora SAM, David L, Pimental R, Mulukutla S, Tabae A, Bristow R et al. Increased Reactive Oxygen Species Production and Functional Alterations in Antioxidant Enzymes in Human Failing Myocardium. *Congestive Heart Failure*. 2005; 11: 2130-44.
- 63.- Castro P, Greig D, Pérez O, Chiong M, Díaz G, Vukasovic JL et al. Relation Between Oxidative Stress, Catecholamines, and Impaired Chronotropic Response to Exercise in Patients with Chronic Heart Failure Secondary to Ischemic or Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *American Journal of Cardiology*. 2003; 92: 215-8.
- 64.- Yuan F, Zhang L, Li YQ, Teng X, Tian SY, Wang XR, Zhang Y. Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia Improves Cardiac Function through inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress. *Scientific Reports*. 2017; 7(1):7922.
- 66.- Sozen E, Karademir B, Ozer NK. Basic mechanisms in endoplasmic reticulum stress and relation to cardiovascular diseases. *Free Radical Biology and Medicine*. 2015; 78:30-41.
- 67.- Wagner-Grau P. Fisiopatología de la hipertensión arterial. *Anales de la Facultad de Medicina*. 2010; 71(4):225-9.
- 68.- Moraga FA, Reyes RA, Herrera EA, Riquelme RA, Ebensperger G, Pulgar VM, Parer JT, Giussani DA, Llanos AJ. Role of the α -adrenergic system in femoral vascular reactivity in neonatal llamas and sheep: a comparative study between highland and lowland species. *American Journal of Physiology*. 2011; 301(4): 1153–1160.
- 69.- Cossio-Bolaños M, Gómez-Campos R, Vargas-Vitoria R, Hochmuller Fogaça RT, de Arruda M. Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos Wistar. *Nutrición Hospitalaria*. 2013; 28(6): 2151-2156.
- 70.- Ministerio de Salud. Indicadores Básicos de Salud. Chile; 2014: 1-17.

71.- Herrera EA, Farías JG, Ebensperger G, Reyes RV, Llanos AJ, Castillo RL. Pharmacological approaches in either intermittent or permanent hypoxia: A tale of two exposures. *Pharmacological Research*. 2015; 101:94-101.

7. ANEXOS

7.1. Esquema de Modelo Experimental



7.2. Pesos al término de cada ciclo

Pesos ratas HIA. Las ratas ingresaron a la cámara hipobárica con un peso promedio 280 gramos, se realizó la medición del peso al término de cada ciclo. Además, posterior a la eutanasia se midió cada uno de los órganos, los cuales se evaluaron en relación a la masa corporal total. No se encontraron diferencias al comparar HIA con NA al término de cada ciclo, mientras que al comparar el peso de cada órgano se observó un aumento de 20,73% en el bazo del grupos HIA.

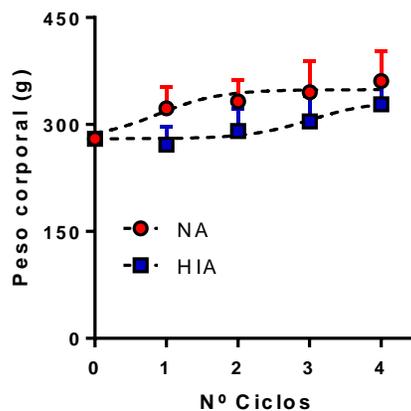


Figura 29. Pesos al término de cada ciclo. Se midió el peso corporal al finalizar cada ciclo en gramos (g). Los datos están expresados en promedios \pm ESM. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIA vs NA (n= NA:12, HIA:13).

Tabla 7.- Porcentaje de peso Corporal grupos agudos

A.

NA	Total Corporal	Corazón	% PC	Pulmón	% PC	Hígado	% PC	Bazo	% PC	Riñón Derecho	% PC	Riñón Izquierdo	% PC	Testículo Izq	% PC	Testículo Der	% PC
Promedio	389,32	1,58	0,40	2,63	0,67	12,4	3,18	1,11	0,28	1,36	0,34	1,31	0,33	2,82	0,72	2,88	0,72
SEM	15,91	0,07	0,02	0,21	0,08	0,96	0,36	0,06	0,01	0,04	0,01	0,05	0,01	0,09	0,07	0,12	0,08

B.

HIA	Total Corporal	Corazón	% PC	Pulmón	% PC	Hígado	% PC	Bazo	% PC	Riñón Derecho	% PC	Riñón Izquierdo	% PC	Testículo Izq	% PC	Testículo Der	% PC
Promedio	368,3	1,52	0,41	2,02	0,55	10,96	2,97	1,34	0,36	1,32	0,35	1,40	0,38	2,44	0,66	2,69	0,73
SEM	15,20	0,05	0,01	0,29	0,17	0,88	0,30	0,08*	0,03	0,07	0,01	0,15	0,06	0,16	0,04	0,11	0,03

Porcentaje de peso corporal, se realizó la medición de cada órgano y se obtuvo el porcentaje en relación al peso corporal, imagen (A) controles Agudos, (B) Hipoxia hipobarica intermitente aguda, porcentaje de peso corporal (%PC); Los datos están expresados en promedios ± ESM; Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIA vs NA (n= NA:12, HIA:13).

Pesos Ratas Crónicas

Se determinó el peso corporal al término de cada ciclo, donde no se encontraron diferencias significativas al comprar HIA con NA. Además, posterior a la eutanasia se midió cada uno de los órganos los cuales se evaluaron en relación a la masa corporal total, solo observando un aumento de 46,87% en el Pulmón HIC.

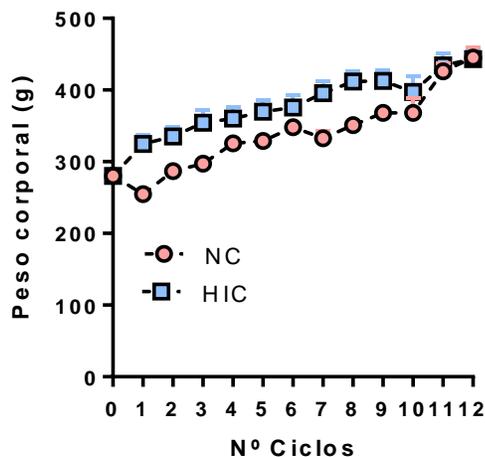


Figura 30. Peso corporal al final de cada ciclo. Se realizó la medición de peso expresado en gramos al terminar cada ciclo. Los datos están expresados en promedios ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIC vs NC (n= NC: 7; HIC:7).

Tabla 8.- Porcentaje de peso Corporal grupos agudos

A.

NC	total/gr	Corazón	% pc	Pulmón	% pc	Higado	% pc	Bazo	% pc	Riñon Der	% pc	Riñon Izq	% pc	Testiculo Izq	% pc	Testiculo Der	% pc
Promedio	389,99	1,34	0,34	1,92	0,49	10,74	2,75	0,86	0,22	1,09	0,28	1,07	0,27	2,59	0,66	2,62	0,67
ESM	63,44	0,22	0,01	0,29	0,03	1,70	0,01	0,13	0,06	0,177	0,04	0,17	0,03	0,44	0,04	0,43	0,08

B.

HIC	total/gr	Corazón	% pc	Pulmón	% pc	Higado	% pc	Bazo	% pc	Riñon De	% pc	Riñon Izq	% pc	Testiculo Izq	% pc	Testiculo Der	% pc
Promedio	406,375	1,45	0,36	2,82*	0,69	10,43	2,57	1,05	0,26	1,17	0,29	1,13	0,28	2,47	0,61	2,45	0,60
ESM	9,62	0,08	0,02	0,09	0,02	0,62	0,01	0,04	0,01	0,02	0,06	0,01	0,01	0,33	0,02	0,28	0,02

Porcentaje de peso corporal, se realizó la medición de cada órgano y se obtuvo el porcentaje en relación al peso corporal, imagen (A) controles crónico, (B) Hipoxia hipobárica intermitente crónico, porcentaje de peso corporal (%PC). Los datos están expresados en promedios ± ESM. Diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) = * HIC vs NC (n= NC:7, HIC:7).

7.3. Publicaciones:

1.- Aguilar M, González-Candia A, Rodríguez J, Carrasco-Pozo C, Cañas D, García-Herrera 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; Jan 26;19(2). pii: E366. doi: 10.3390/ijms19020366 (se adjunta copia).

7.4 Participación en congresos y reuniones científicas:

- 1.- II Congreso Investigación e Innovación en Salud Vascular. Universidad del Bio-Bio, Chillán, Julio 2017. “Chronic intermittent hypobaric hypoxia have differential effect on carotid and femoral vascular function”. Premio al mejor poster del Congreso.
- 2.- II Feria de Grados Académicos, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago, Septiembre 2017. “Hipoxia Hipobárica Intermitente: Función Cardíaca y Vascular”.
- 3.- XXXIX Congreso Sociedad de Farmacología de Chile, Puerto Varas, Noviembre 2017. “Efectos cardíacos y vasculares a exposición a hipoxia hipobárica intermitente: papel del estrés oxidativo”.
- 4.- 5th International Atacama-Leh Symposium Coping with hypoxia at high altitude: How lung, blood and brain respond and crosstalk, Marzo 2018. “Intermittent hypobaric hypoxia: acute and chronic effects on cardiovascular function, structure and oxidative stress”.

7.5. Premios:

- 1.- II Congreso Investigación e Innovación en Salud Vascular, Universidad del Bio-Bio, Julio 2017, Mejor poster.