



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Mecanismos implicados en la respuesta cerebral frente a la exposición a la hipoxia respiratoria: Efecto neuroprotector de la hipoxia intermitente

Débora Coimbra Costa Pinto

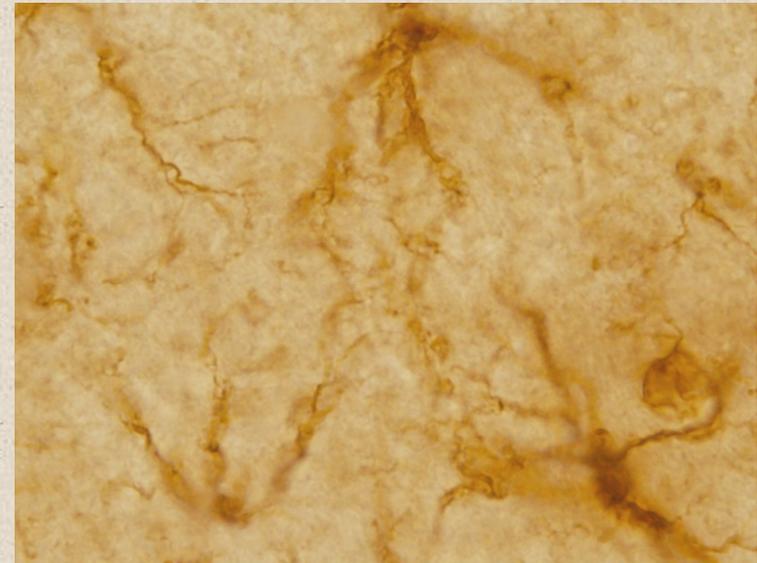
ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Mecanismos implicados en la respuesta cerebral frente a la exposición a la hipoxia respiratoria:
Efecto neuroprotector de la hipoxia intermitente

**Mecanismos implicados en la respuesta cerebral
frente a la exposición a la hipoxia respiratoria:
Efecto neuroprotector de la hipoxia intermitente**



Las neuronas son células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental."

Santiago Ramón y Cajal

Débora Coimbra Costa Pinto

Tesis doctoral

2015



Facultat de Biologia
Departamento de Fisiología e Inmunología

**Mecanismos implicados en la respuesta
cerebral frente a la exposición a la hipoxia
respiratoria: Efecto neuroprotector de la
hipoxia intermitente**

Tesis doctoral

Débora Coimbra Costa Pinto

2015



UNIVERSITAT DE BARCELONA



**Departamento de Fisiología e Inmunología
Facultat de Biología**

Mecanismos implicados en la respuesta cerebral frente a la exposición a la hipoxia respiratoria: Efecto neuroprotector de la hipoxia intermitente

Trabajo presentado por Débora Coimbra Costa Pinto,
para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona
Tesis realizada sobre la dirección de Dr. Ramón Rama

Dr. Ramón Rama Bretón
Profesor Catedrático de la UB

Débora Coimbra Costa Pinto
.....Doctoranda

Barcelona, a 03 de diciembre de 2015

A mis amigas y compañeras de trabajo Lilian Becerra, Encarnación Capilla y Vania Hirle quienes fueron un gran apoyo antes y durante el tiempo en que decidí hacer un doctorado fuera de mi país.

A mis padres quienes me apoyaron todo el tiempo.

A mis hermanos que amo.

A mi esposo Fernando quien me apoyo y alentó para continuar.

A mis maestros quienes nunca desistieron al enseñarme, a ellos que continuaron depositando su esperanza en mí.

A los pacientes y alumnos que pasaron por mi vida porque fueran un estímulo para empezar el proceso de investigación.

A los sinodales quienes estudiaron mi tesis y la aprobaron.

A todos los que me apoyaron para escribir y concluir esta tesis.

Sobre todo a Dios que es mi motivación diaria y es el mantenedor de todo

Para ellos es esta dedicatoria de tesis, pues es a ellos a quienes se las debo por su apoyo incondicional.

*Las neuronas son células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma,
cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental."*

Santiago Ramón y Cajal

*"Si no puedes volar entonces corre, si no puedes correr entonces camina,
si no puedes caminar entonces arrástrate, pero sea lo que hagas,
sigue moviéndote hacia delante."*

Martin Luther King

Agradecimientos

Esta tesis doctoral, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de la autora, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación de todas y cada una de las personas que a continuación citaré y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de dudas y desesperación.

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón, por la paciencia e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio y sobre todo de aprendizaje.

Agradecer hoy y siempre a mi familia porque a pesar de no estar presentes físicamente, sé que procuran mi bienestar desde mi país, Brasil, y está claro que si no fuese por el esfuerzo realizado por ellos, mis estudios de tercer ciclo no hubiesen sido posible.

A mis padres Paulo y Rosi, mi abuela Yllene, mis hermanos Augusto y Tiago y mi cuñada Tamara, porque a pesar de la distancia, el ánimo, apoyo y alegría que me brindan me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

A mi marido Fernando que desde el primer momento me brindo y me dio todo el apoyo, paciencia y contribuyo para que yo llegará a concluir este trabajo de la mejor manera posible.

A Encarne, por ser la persona que ha compartido el mayor tiempo a mi lado, porque en su compañía las cosas malas se convierten en buenas, la tristeza se transforma en alegría y la soledad no existe. Por haber mi enseñado con su paciencia lo básico de lo básico para empezar y acabar una tesis, sin tu apoyo hubiera sido muy duro acabar esta etapa.

A Tiago Coimbra, por su ayuda, apoyo y sus conocimientos cuando más la necesitaba, por ser una persona con la que puedo contar siempre, por el cariño que me brinda y los ánimos que me da.

Al Dr. Fernando Aguado, por la colaboración y sus conocimientos brindados durante la tesis.

A mi tutor y director de tesis, Dr. Ramón Rama por haber aceptado estar con una estudiante con pocos conocimientos en biología y por la paciencia que tuvo conmigo durante esta etapa. Agradezco también por la libertad y espacio que mi concedió durante la elección de los experimentos y técnicas a realizar, esto contribuyo mucho en mi formación.

A Dr^a Teresa Carbonell y Dr^a Norma Alva por sus conocimientos y por el apoyo que mi habéis brindado.

A Fernando Garzón por ser un óptimo compañero de laboratorio y por estar siempre a disposición.

A mis flores Marcia, Angela, Aline, Maira, Eliana, Mirian, Marilda y Alaine, por hacerme reír y por serén mi familia aquí. Sois como “cargadoras de pillas”.

A las secretarias Carmen y Margarita por la disposición siempre en ayudar. Carmen por su alegría, es animador.

A nuestra técnica de laboratorio Margarita.

A Dr. Ginés y sus conocimientos en el tema, por ayudarme en la llegada al departamento.

A Dr^a Vânia Hirle y Lilian Becerra por mi ayudaren y apoyaren en los tramites y mi venida a Barcelona.

Al equipo de peces del departamento por serén un apoyo inigualable.

A la familia Chök que muchas veces mi necesito i no pude estar presente o dá todo lo que debería haber dado.

A los alumnos que pasaron por el laboratorio: Tatiana Ribas, Débora, Txema, Alexa.

En general quisiera agradecer a todos, cada uno a su manera.

Índice

Abreviaturas	17
I. Introducción	23
1. Función del oxígeno en los seres vivos.....	25
1.1 Captación y transporte de oxígeno. La presión de oxígeno en los tejidos	26
1.2. El oxígeno en el cerebro.....	27
1.2.1. <i>Metabolismo energético cerebral</i>	27
1.2.2. <i>El aporte de oxígeno al cerebro</i>	30
1.2.3. <i>Detección y regulación sistémica de la tensión de oxígeno</i>	34
2. La hipoxia	35
2.1. Tipos de hipoxia	36
2.2. La hipoxia respiratoria	36
2.2.1. <i>La “hipoxia continua aguda” (HA)</i>	38
2.2.2. <i>“Hipoxia continua crónica” (HC)</i>	38
2.2.3. <i>“Hipoxia intermitente” (HI)</i>	38
2.3. Ventajas del uso de las cámaras en el estudio de los efectos de la hipoxia	39
2.4. Efectos fisiológicos de la hipoxia	40
3. Hipoxia Cerebral	41
3.1. Mecanismos moleculares inducidos por la hipoxia en las neuronas.....	42
3.1.1. <i>Excitotoxicidad</i>	44
4. Estrés Oxidativo	47
4.1 Formación de ROS	47
4.2 Antioxidantes biológicos; mecanismos enzimáticos y no enzimáticos de eliminación de ROS.....	50
4.2.1. <i>Superóxido dismutasa (SOD)</i>	50
4.2.2. <i>Glutación</i>	51
4.2.3. <i>Glutación peroxidasa (GPx)</i>	52

4.2.4. <i>Glutación reductasa (GR)</i>	53
5. Disfunción mitocondrial y apoptosis	55
6. Factores de transcripción y su papel en la hipoxia.....	59
7. Neuroprotección frente al daño oxidativo.....	60
7.1 Eritropoyesis y Angiogénesis.....	61
7.2 Activación de los astrocitos.....	64
8. Proteínas anti-apoptóticas	66
9. Reoxigenación y Pre-condicionamiento	67
II. Objetivos	69
III. Materiales y Métodos	73
3.1. Procedimiento de investigación	75
3.2. Diseño experimental	75
3.3. Extracción del tejido cerebral	81
3.4. Preparación de los homogenados con tejido cerebral	82
3.5. Cuantificación de proteínas.....	83
3.6. Daño oxidativo y sistemas antioxidantes	84
3.6.1. <i>Biomarcadores de estrés oxidativo/nitrativo</i>	84
3.6.2. <i>Determinación de actividades enzimáticas</i>	87
3.7. Homogenización del tejido para Western blot.....	92
3.7.1. <i>Análisis de Western blot</i>	92
3.8. Inmunohistoquímica.....	94
3.8.1. <i>Obtención de las muestras</i>	97
3.9. Análisis estadístico.....	97
IV. Resultados.....	98
4. Resultados	99
4.1 Experimento 1: Ratas expuestas a hipoxia normobárica aguda (6 h) severa (7% FiO ₂) con diferentes tiempos de re-oxigenación (0 h, 24 h y 48 h).....	101

4.1.1. <i>La exposición a hipoxia respiratoria aguda severa causa hipoxia en el cerebro</i>	101
4.1.2. <i>Marcadores de Estrés Oxidativo: La hipoxia aguda severa causa estrés oxidativo en el cerebro</i>	103
4.1.3. <i>Actividad antioxidante</i>	106
4.1.4. <i>Expresión de Proteínas Inductoras de Apoptosis</i>	111
4.1.5. <i>Factores de Transcripción</i>	116
4.2 Experimento 2: Efecto de la hipoxia hipobárica intermitente antes de la exposición a hipoxia normobárica severa (7% FiO ₂) de 6 horas de duración. Neuroprotección.....	121
4.2.1. <i>Efecto de la hipoxia sobre la peroxidación lipídica</i>	121
4.2.2. <i>Efecto de la hipoxia sobre la producción de óxido nítrico</i>	123
4.2.3. <i>Actividad antioxidante en el cerebro de ratas expuestas a hipoxia</i>	124
4.2.4. <i>Factores de Transcripción</i>	128
4.2.5. <i>Expresión de Proteínas Inductoras de Apoptosis</i>	133
4.2.6. <i>Expresión de Proteínas Involucradas en la Angiogénesis y Neuroprotección</i>	138
4.2.7. <i>Expresión de Proteínas Antiapoptóticas</i>	141
V. Discusión	149
5.1 Efecto de la hipoxia respiratoria aguda severa y de la re-oxigenación sobre el cerebro	151
5.1.1. <i>La hipoxia respiratoria aguda severa induce hipoxia en el cerebro</i>	151
5.1.2. <i>La hipoxia respiratoria aguda severa induce estrés oxidativo en el cerebro</i>	152
5.1.3. <i>La hipoxia respiratoria causa alteración en las mitocondrias y activa la cascada apoptótica en el cerebro</i>	153
5.1.4. <i>La re-oxigenación restaura el equilibrio redox y reduce la actividad apoptótica inducida por la hipoxia</i>	154
5.2. Efecto neuroprotector de la exposición intermitente a la hipoxia respiratoria moderada frente a la hipoxia respiratoria aguda severa	158
5.2.1. <i>La hipoxia respiratoria moderada intermitente induce hipoxia en el cerebro</i>	159
5.2.2. <i>Efecto de la hipoxia respiratoria moderada intermitente en el cerebro</i>	159

5.2.3. <i>La hipoxia respiratoria moderada intermitente induce neuroprotección frente a la hipoxia respiratoria aguda severa</i>	160
VI. Conclusiones	167
VII. Bibliografía	171

Abreviaturas

Abreviaturas

AIF: Factor inductor de apoptosis

AMPA: Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

AOPP: Advanced Oxidation Protein Products

Bad - Promotor de muerte asociado a Bcl-XL/Bcl-2.

Bak - Bcl-2 antagonista/killer.

Bax - Proteína x asociada a Bcl-2.

Bcl-2 - Célula B del linfoma 2, del inglés B-cell lymphoma 2.

Bcl-XL - Forma larga del Bcl-X, anti-apoptótico.

Bid - Dominio de muerte para la interacción BH3, del inglés BH-3 Interacting Domain Death.

Bik - Del inglés Bcl-2 interacting killer

BSA -Albumina sérica bovina.

CADV: Canal de aniones dependiente de voltaje

CBF: flujo sanguíneo cerebral local

CMRO₂: Supresión de la tasa metabólica cerebral de oxígeno

DEM: Desviación Estándar de la Media

EPO: Eritropoyetina

ETC: Cadena de transporte electrónica

FiO₂: Fracción inspirada de oxígeno

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación

GSK3: Glucógeno sintasa quinasa-3

GSSG: Glutación oxidado

GST: Glutathion-S-transferasa

H: Grupo de hipoxia

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HA: Hipoxia continua aguda

HC: Hipoxia continúa crónica

HHI: Hipoxia Hipobárica Intermitente

HHI+HS: Hipoxia Hipobárica Intermitente + Hipoxia Severa

HI: Hipoxia intermitente

HIA: Hipoxia Intermitente aguda

HIC: Hipoxia Intermitente crónica
HIF: Factor inductor de hipoxia
HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia 1 alfa
HRE: Elementos de respuesta a la hipoxia
HS: Hipoxia Severa
HSP: Proteínas de estrés calorico
IAPS: proteínas inhibidoras de apoptosis
MDA: Malondialdehido
MME: Membrana mitocondrial externa
NADPH: Nicotinamida-adeninucleótido-Fosfato
NF κ B: Factor nuclear kappa B
NF- κ B: Factor nuclear kappa B
NMDA: Glutamato N-metil-D-aspartato
NMDARs : receptor de glutamato N-metil-D-aspartato
NO: Óxido nítrico
NOS: Óxido nítrico sintasa
O₂: Oxígeno molecular
O₂⁻: Superóxido
OH⁻: Radical hidroxilo
ONOO: Peroxinitrito
ONOO-: Peroxinitrito
PaCO₂: Presión arterial del CO₂
Pb: Presión barométrica
P_B: Presión barométrica
PCr: Fosfocreatina
PHDs: Prolil hidroxilasas
PO₂: Presión parcial de oxígeno
PPM: Poros de permeabilidad de la membrana
PTP: Poro de transición de permeabilidad
RNS: Especies de nitrógeno reactivas
RNS: Radicales libres derivados del óxido nítrico
RO-1: Grupo hipoxia severa + re-oxigenación de 24 h en normóxia
RO-2: Grupo hipoxia severa + re-oxigenación de 48 h en normóxia
ROS: Especies de oxígeno reactivas

SN: Sistema nervioso

SOD: Superoxido dismutasa

TBA: Ácido tiobarbitúrico

TBARS: Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

XO: Xantina oxidasa

I.-Introducción

1. Función del oxígeno en los seres vivos

El descubrimiento del oxígeno como componente del aire realizado independientemente por el sueco Carl Wilhelm Sheele en 1772 (resultados publicados en 1977) y el científico inglés Joseph Priestley en 1774 y 2010, está considerado uno de los mayores descubrimientos científicos (para una visión histórica, ver Ref. Severinghaus, 2003).

El oxígeno es un elemento esencial para todas las formas complejas de vida (Lyons y col., 2014) donde juega un papel central en el metabolismo energético. Las principales vías del metabolismo energético son notablemente similares en todas las células lo que indica que surgieron temprano en el proceso de la evolución y se han conservado. Por ejemplo, todas las células utilizan ATP como la moneda de energía para impulsar la síntesis de los componentes celulares y llevar a cabo otras actividades que requieren energía. Se piensa que los mecanismos por los que las células generan ATP han evolucionado secuencialmente: primero la glucólisis, a continuación, la fotosíntesis y finalmente el metabolismo oxidativo. En la glucólisis, la glucosa se descompone para producir 2 moléculas de ATP. En la fotosíntesis, la energía del sol se cosecha para producir glucosa, lo que crea el oxígeno molecular (O_2) como un subproducto y provoca que el oxígeno se convierta abundante en la atmósfera terrestre. En el metabolismo oxidativo, el oxígeno se usa para descomponer la glucosa mucho más eficiente que en la glucólisis, produciendo 36 moléculas en lugar de 2 ATP. Debido a esta eficiencia, casi todas las células, incluyendo actuales arqueas, bacterias y células eucariotas utilizan procesos oxidativos como su principal fuente de energía.

La dependencia del oxígeno y la capacidad de mantener su homeostasis son características de todos los organismos superiores cuya actividad vital se relaciona con la producción de energía aeróbica principalmente mediante la fosforilación oxidativa mitocondrial. La vida aeróbica tal como la conocemos está íntimamente ligada a la actividad mitocondrial. En ese proceso de obtener energía (ATP) el oxígeno desempeña un papel insustituible como aceptor final de electrones. La capacidad de mantener la homeostasis del O_2 es esencial para la supervivencia de todas las especies de invertebrados y vertebrados. Todos los grandes organismos se enfrentan al reto fisiológico fundamental de hacer coincidir el suministro de oxígeno a las necesidades de los tejidos que respiran. En muchas especies animales, por su gran tamaño y por la capacidad de movimiento rápido aumentan la dificultad de esta tarea. El aporte de oxígeno a todas las células está asociado con el desarrollo de una infraestructura fisiológica compleja capaz de captar oxígeno y nutrientes desde el ambiente y su transporte a las células y eliminar los productos de desecho (CO_2 , ácido láctico) desde las células más allá de los límites de difusión de estas moléculas. Todos los grandes organismos se enfrentan al reto fisiológico fundamental de hacer coincidir el suministro de oxígeno

a las necesidades de los tejidos que respiran. Para conseguirlo, los organismos superiores han desarrollado sofisticados sistemas fisiológicos capaces de capturar, unir, transportar y liberar el oxígeno molecular a todas las células del cuerpo, manteniendo estrictamente la homeostasis del oxígeno, es decir, la concentración de O_2 , incluso dentro de una sola célula, dentro de un rango fisiológico estrecho, permitiendo que la célula viva y funcione en regiones con una distribución heterogénea PO_2 . En los animales superiores, los órganos especializados evolucionaron para facilitar la entrega de oxígeno y los pulmones, el corazón, la sangre y el sistema vascular están dedicados a este fin. El establecimiento y la regulación precisa de estos sistemas proporcionan una base importante para la homeostasis del O_2 . En el hombre, la cantidad total de oxígeno en el cuerpo es de ~1,5 litros, de los que ~50 ml están almacenados en los tejidos. La coordinación de estos sistemas homeostáticos complejos requiere mecanismos precisos para detectar y responder a señales de error en la homeostasis del oxígeno (Carbonell y Rama 2009).

1.1 Captación y transporte de oxígeno. La presión de oxígeno en los tejidos

A nivel del mar la presión barométrica del aire seco es de 760 mm Hg, y la presión parcial debida al oxígeno (PO_2) es de unos 160 mm Hg. Aunque el porcentaje de oxígeno en la atmósfera permanece relativamente sin cambios, a medida que nos alejamos del nivel del mar y se gana altura, hay una reducción en la presión barométrica que causa una disminución obligatoria en la presión parcial del oxígeno atmosférico, definido como la presión barométrica (P_b) x % de oxígeno (0,209) en el mezcla de gas. En altitud, la presión barométrica disminuye y consecuentemente, aunque la proporción de oxígeno sigue siendo el 20,94 %, la PO_2 también disminuye. A una altitud de 5800 m, la presión barométrica es la mitad de la del nivel del mar (380 mm Hg) y también el valor de la PO_2 es la mitad de su valor al nivel del mar, 80 mm Hg. La presión barométrica en el Monte Everest es de 251 mmHg equivalentes a 53 mmHg O_2 .

El tiene una concentración de oxígeno de aproximadamente 20,94 %, ($PO_2 = 160$ mmHg) a nivel del mar. Aire inhalado que pasa a través de la tráquea muestran una reducción en la P_2 a 150 mmHg. En los alvéolos de los niveles de oxígeno son alrededor de 110 mmHg. La sangre oxigenada en las arterias tiene rango PO_2 75-100 mmHg. La sangre venosa tiene una PO_2 de 30-40 mmHg (Silver y Erecinska, 1998). Los niveles de oxígeno difieren mucho dependiendo de los tejidos y la tolerancia a los cambios en los niveles de PO_2 . Por ejemplo, los niveles de PO_2 cerebrales son en 33.8 ± 2.6 mmHg. Por el contrario, la PO_2 de riñón es de 72 ± 20 mmHg. El músculo esquelético PO_2 es de alrededor de 29.2 ± 1.8 . Tejidos cerebrales no pueden tolerar PO_2 menores mientras que el músculo puede soportar cambios en los niveles de PO_2 más bajos que el estado de reposo. Cada sitio anatómico en nuestro cuerpo tiene diferentes puntos de ajuste para las

necesidades de oxígeno. Esta heterogeneidad es debida a diferencias en la vascularización, difusión tisular y al consumo específico de oxígeno para cada célula (Leithner y Roy, 2014).

1.2. El oxígeno en el cerebro

El cerebro de los mamíferos es un órgano aeróbico que depende de un aporte continuo de oxígeno y glucosa para mantener su integridad estructural y funcional. Así, una relativa reducción moderada en el aporte de oxígeno se vuelve potencialmente mortal y puede resultar en la pérdida severa de la función cerebral. En particular, reducción en la disponibilidad de oxígeno (hipoxia) no puede ser tolerada durante periodos largos de tiempo debido al aporte insuficiente de energía al cerebro por la glucólisis anaeróbica. En humanos, si el aporte de oxígeno está suficientemente comprometido, a los pocos segundos se puede producir una pérdida de conciencia y muerte neuronal a los pocos minutos (Haddad y Jiang, 1993). En el cerebro de mamíferos, los niveles de oxígeno en el espacio intersticial son bajos y no uniformes, oscilando en un rango desde ~1 a 5% equivalente a 7.5-38 mmHg. En el tejido cerebral, una presión parcial de oxígeno de 30 mmHg es considerada normal (Silver y Erecinska, 1998). La comunidad científica acepta que si la P_{O_2} en el tejido cerebral es superior a 35 mmHg (4.6%), la oxigenación normal del cerebro está asegurada.

1.2.1 *Metabolismo energético cerebral*

El cerebro tiene una actividad metabólica muy superior a la que le corresponde en función de la relación de su tamaño con el resto del cuerpo. En el humano adulto, el cerebro representa alrededor del 2% del peso corporal total y sin embargo su consumo basal de energía representa el 20% de toda la energía basal consumida por el organismo (Mink y col., 1981). ¿Cuál es la naturaleza de esta actividad del cerebro “en reposo” que implica el gasto de una gran cantidad de los recursos energéticos del cerebro? Las evaluaciones acerca del balance de energía del cerebro usando una variedad de métodos (para una revisión, ver Raichle y Mintun, 2006) sugieren que el 60-80% del consumo total de energía del cerebro se dedica a mantener los gradientes iónicos transmembrana y en generar la liberación del glutamato implicado en las formación de las corrientes sinápticas que causan los pequeños campos eléctricos que dan lugar a las ondas del EEG. La base de esta estimación, sin embargo, debe ser vista con cautela por varias razones. En primer lugar, es importante tener en cuenta que la mayor parte de la actividad eléctrica permanente de la neocorteza resulta de despolarizaciones sub-umbrales en lugar de disparos del potencial de acción (Lowen y col., 1997). En segundo lugar, las estimaciones actuales no consideran las demandas energéticas debidas a la actividad de las interneuronas inhibitorias (Buzsaki y col., 2007), astrocitos (Magistretti y Chatton, 2005) y otras células de apoyo que forman parte del tejido cerebral (Funfschilling y col., 2012). Además, es importante destacar que la biosíntesis en las neuronas

puede ser un contribuyente significativo al coste energético de la función cerebral (Locasale y Cantley, 2011).

Eve Marder ha descrito muy bien la situación (Mader y Goillard, 2006): "Los seres humanos y otros animales de larga vida tienen neuronas que viven y funcionan durante décadas. Por el contrario, las proteínas de los canales iónicos, receptores sinápticos y los componentes de las vías de transducción de señales están en constante reemplazados en la membrana, con una vida media de minutos, horas, días o semanas. Por lo tanto, cada neurona se está constantemente reconstruyendo a partir de sus proteínas constituyentes, utilizando toda la maquinaria molecular y bioquímica de la célula. Esto permite cambios plásticos en el desarrollo y el aprendizaje, pero también plantea el problema de cómo se mantiene estable la función neuronal. . .". Como ha sido señalado (Locasale y Cantley, 2011), el mantenimiento celular basal del tipo que Eve Marder describe es muy costoso, y probablemente algo subestimado (Rodríguez-Rodríguez y col., 2013).

El cerebro tiene una elevada demanda de oxígeno y glucosa y depende casi exclusivamente de la fosforilación oxidativa mitocondrial para obtener la energía necesaria para mantener su función. En el cerebro, la mayor parte de este oxígeno se usa para producir el ATP necesario para mantener los potenciales de membrana necesarias para la señalización eléctrica con sinápticas y potenciales de acción (Harris et al., 2012). El objetivo de la fosforilación es la síntesis de ATP por medio de la transferencia de electrones a través de la cadena de citocromos mitocondriales para generar un gradiente de protones en la membrana interna de la mitocondria. El potencial electroquímico de este gradiente es usado en la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico por acción de la ATP-sintasa. En este proceso, el oxígeno es el aceptor final de electrones. Este proceso de fosforilación oxidativa requiere un transporte de electrones eficiente a lo largo de la cadena de transporte de electrones situada en la membrana interna de la mitocondria y el O_2 actúa como aceptor final de electrones. Una fosforilación oxidativa sin perturbaciones y completa requiere un suministro continuo de oxígeno del ambiente. Por lo tanto un suministro insuficiente de oxígeno puede comprometer a la cadena de transporte de electrones con el resultado de una disminución en la producción de ATP.

La dependencia de las células de los mamíferos es de un aporte constante y abundante de ATP implica una dependencia de una adecuada provisión de oxígeno. En muchos vertebrados, incluyendo los seres humanos adultos, interrupción del suministro de oxígeno al cerebro por más de unos pocos minutos conduce a daños neurológicos irreversibles, incluyendo la muerte neuronal. Sin fosforilación oxidativa, los procesos dependientes de ATP neuronales incluido el transporte de iones y recaptación neurotransmisores declinan bruscamente. Sin bombeo, gradientes iónicos fallan y las neuronas se despolarizan, con la liberación de niveles excesivos de neurotransmisores

excitotóxicos tales como glutamato y dopamina. La sobre-estimulación de glutamato [N-metil-D-aspartato (NMDA) y alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA)] receptores aumenta los niveles de calcio intracelular y desencadena múltiples cascadas internas que resultan en la celda daño y muerte, incluyendo la activación de las lipasas, proteasas y endonucleasas, y mitocondrial dependiente de la apoptosis (Lipton, 1999). No todos los vertebrados, sin embargo, son igualmente susceptibles a daño cerebral resultante de períodos de bajo nivel de oxígeno. Especializaciones de la fisiología del cerebro han evolucionado en ciertas especies de vertebrados para hacer frente a la falta de oxígeno (hipoxia).

La actividad de cerebro, especialmente la transmisión sináptica, requiere un elevado aporte energético y el cerebro genera la mayoría de su ATP a través de metabolismo oxidativo de glucosa (Hall y col., 2012; Howart y col., 2012). El índice de oxígeno-glucosa del cerebro está cerca de seis en estado de reposo, por lo tanto el cerebro consume, en promedio, seis moléculas de oxígeno por molécula de glucosa. La demanda de alta energía genera la necesidad de una gran cantidad de oxígeno suministrado a través de la corriente sanguínea. Como la solubilidad del oxígeno en el agua es muy baja, una molécula de transporte, hemoglobina, aumenta el contenido de oxígeno de la sangre arterial desde 150 nmol/ml disuelto en el plasma a alrededor de 9,000 nmol/mL en la saturación de oxígeno arterial fisiológico. Incluso con casi la mitad del volumen de sangre dedicado al oxígeno transporte de las células rojas de la sangre (10% de la carga de trabajo cardíaca en reposo es requerida para bombear moléculas de transporte de oxígeno al cerebro), el número de moléculas de oxígeno en la sangre arterial excede el número de moléculas de glucosa sólo por un factor de 1,5 (la concentración fisiológica de glucosa es de alrededor de 6,000 nmol/ml). Como el cerebro extrae seis moléculas de oxígeno por molécula de glucosa, la proporción de oxígeno extraído de la sangre durante el paso del capilar a través del tejido cerebral (fracción de extracción de oxígeno) excede en gran medida la proporción de glucosa extraída. En condiciones fisiológicas, la fracción de extracción de oxígeno es de alrededor de 30% a 50% mientras que la fracción de extracción de la glucosa es sólo alrededor del 10% (Madsen y col., 1999). La tensión media de oxígeno del capilar en el cerebro es de alrededor de 40 a 50 mmHg (Vovenko, 1999). La PO_2 media del tejido cerebral es de alrededor de 20 a 30 mm Hg (Ndubuizu y LaManna 2007). La PO_2 tisular exhibe significativa micro variabilidad regional, con valores considerablemente más bajos en regiones distantes de los microvasos con alta PO_2 (Ndubuizu y LaManna 2007). La extensión de la variabilidad de la PO_2 tisular depende de la geometría de la red vascular, de la densidad de los capilares, la tasa metabólica de oxígeno, y el contenido de oxígeno capilar.

1.2.2. El aporte de oxígeno al cerebro

La función cerebral normal depende críticamente de la regulación de momento a momento del suministro de oxígeno por el torrente sanguíneo para satisfacer las necesidades metabólicas cambiantes. Los órganos y tejidos aseguran el suministro de nutrientes mediante el ajuste del tono arterial y arteriolas y el flujo sanguíneo local. Los capilares, a su vez, llevan sangre en íntimo contacto con los tejidos facilitando la difusión a las células cercanas. De manera que los capilares mismos son parte de la regulación del aporte de nutrientes a un área específica del cerebro (Jespersen y Østergaard, 2012).

En el cerebro, una serie de mecanismos, definidos como acoplamiento neurovascular convergen en las arteriolas para ajustar el flujo sanguíneo cerebral local (CBF).

La concentración de oxígeno del tejido está determinada por la PO_2 arterial y el flujo sanguíneo por una parte y la tasa de consumo de oxígeno celular por otra, así como por las propiedades de los propios pigmentos respiratorios.

El suministro de oxígeno al cerebro es el resultado de una serie de procesos complejos implicados en el “acoplamiento neurovascular” que van más allá del objetivo de esta tesis (Leither y Roy, 2014). La concentración de oxígeno del tejido está determinada por la PO_2 arterial y el flujo sanguíneo por una parte y la tasa de consumo de oxígeno celular por otra, así como por las propiedades de los propios pigmentos respiratorios. La PO_2 arterial es 90 - 110 mmHg a nivel del mar, mientras que la tensión de oxígeno venoso en el cerebro es 35 - 40 mmHg.

La alta demanda de energía del cerebro requiere CBF constante. Los valores fisiológicos del CBF oscilan entre 45-60 mL/100 gr/minuto que corresponden al 20 % del gasto cardiaco en reposo. A valores de CBF por debajo de 18 mL/100 gr/minuto las neuronas cambian de obtener ATP por metabolismo aeróbico - fosforilación oxidativa- a metabolismo anaeróbico -glucolisis- (Zauner y col., 2002). Cuando el CBF cae a 10 mL/100 gr/minuto se produce en la neurona la alteración de la integridad de la membrana que puede llevar a un daño irreversible y a consecuencias funcionales. El CBF es relativamente constante a pesar de las fluctuaciones de la presión arterial media siempre y cuando se encuentre dentro del rango 60-140 mmHg. Por encima de 140 mmHg se produce edema vasogénico y por debajo de 60 mmHg se produce isquemia. Varios factores intervienen en la regulación del CBF: a) la presión de perfusión cerebral. Es la fuerza conductora del mantenimiento del CBF y resultado de la diferencia entre la presión arterial media y la presión intracraneal. Cuando la presión venosa central es mayor que la presión intracraneal, para evitar que la presión extravascular la colapse, la presión de perfusión pasa a ser la diferencia entre la presión arterial media y la presión venosa central; b) la autorregulación. El cerebro bajo ciertas condiciones a pesar

de las variaciones de la presión de perfusión cerebral, puede mantener un nivel constante del CBF, modificando la resistencia vascular cerebral. Esta capacidad se conoce como autorregulación cerebral pues es la respuesta vascular que determinará vasodilatación ante presiones de perfusión cerebral bajas y vasoconstricción ante presiones de perfusión cerebral altas. Este fenómeno puede ser explicado por diferentes teorías:

Mediante cambios en la resistencia cerebrovascular, el cerebro es capaz de ajustar el consumo de energía con el flujo sanguíneo cerebral para proporcionar una fuente constante de energía basada en la demanda metabólica, a través de la autorregulación cerebral y el control metabólico local. Como protección contra daños en los extremos inferiores o superiores de la presión de perfusión cerebral, el cerebro proporciona un flujo constante por medio de cambios en la resistencia de los vasos, que se constriñen o dilatan dentro de un amplio rango de presiones arterial media (60-150 mm Hg). Sin embargo, fuera de estos rangos pierde la autorregulación y la perfusión se vuelve pasiva y dependiente de la presión. La activación del sistema nervioso simpático puede cambiar hacia arriba los límites inferior y superior de la autorregulación.

Factores metabólicos locales son también esenciales en el mantenimiento de la oxigenación del tejido cerebral. El CBF es extremadamente sensible a aumentos en la presión arterial del CO_2 (PaCO_2). La hipercapnia, situación en la que la PaCO_2 supera los 46 mm Hg, produce una disminución del pH en la sangre que lleva a una estimulación de la ventilación pulmonar y a una dilatación de los vasos cerebrales aumentando la perfusión. Una reducción en la PaO_2 lleva a un aumento CBF por vasodilatación, probablemente debida tanto a un efecto directo sobre los vasos cerebrales e indirecto mediante la liberación de mediadores vasoactivos, tales como el óxido nítrico, iones de hidrógeno, adenosina.

Detalles relevantes del aporte de oxígeno al cerebro aún no han sido completamente aclarados. En concreto, no está claro en qué medida CMRO_2 está limitada por la disponibilidad de oxígeno en condiciones fisiológicas. Estudios sobre los límites de suministro de oxígeno durante la hipoxia, estudios experimentales de cambios basales del CBF y de CMRO_2 , estudios de los cambios transitorios de la concentración de oxígeno durante la respuesta fisiológica del flujo sanguíneo a la activación neuronal y los estudios de las respuestas al flujo de sangre inhibido sugieren que un margen de seguridad existe en el aporte moderado de oxígeno al cerebro y que CBF en reposo no es el único determinante de CMRO_2 (Leithner y Roy, 2014). Regulación de la fosforilación oxidativa en cierta medida independiente del flujo de sangre parece posible. Mecanismos reguladores potenciales incluyen cambios de ADP disponibilidad, efectos inhibitorios de la ATP y NO (óxido nítrico) a la citocromo c oxidasa y los cambios en las concentraciones de Ca^{2+} intracelulares. Sin embargo, detallados estudios in vivo sobre la compleja regulación de la fosforilación oxidativa en el

cerebro son difíciles y muchos detalles siguen siendo desconocidos. Para complicar aún más el panorama, existe una heterogeneidad importante de la disponibilidad de oxígeno en el tejido cerebral, lo que indica que la regulación de CMRO₂ puede variar significativamente entre las zonas cercanas a los microvasos con alta PO₂ y aquellos más distantes. Especialmente en estas áreas, las reservas de oxígeno del cerebro son bajas y si bien la respuesta rápida y gran CBF a la activación neuronal puede no ser necesaria en toda su extensión, que pueden haber evolucionado para asegurarse de que la función del cerebro no se pierde inmediatamente cuando el aporte de oxígeno a los tejidos es deteriorado.

Junto con el CBF, la respuesta ventilatoria permite el mantenimiento del flujo constante de oxígeno al cerebro. Como criterio general, ante una disminución en la PO₂ en el aire inspirado el organismo responde con un aumento de la ventilación (Teppema y Dahan, 2010). Sin embargo, este aumento en la ventilación varía entre individuos y normalmente no se inicia hasta que la PO₂ es reducida a aproximadamente 100 mm Hg (Rahn y Otis, 1949). Igual que ha sido señalado en el control del CBF, la disminución en el pH y el aumento de la PaCO₂ causan un aumento de la ventilación.

Debido a la fuerte dependencia que tienen las neuronas del oxígeno para obtener energía, es crucial para el cuerpo estar preparado para detectar y responder rápidamente a cambios en el contenido de oxígeno del rango fisiológico (Hochachka, 1998). Esta necesidad ha llevado al interés por conocer la llamada "tensión crítica de oxígeno", es decir, el límite de la PO₂ en la mitocondria por debajo de la cual, la mitocondria empieza a disminuir la producción de ATP (Sharp y Bernaudin, 2004). La relación entre la tensión intracelular de oxígeno (PO₂)_i y la respiración mitocondrial es compleja. Cuando la tensión de oxígeno disminuye, la célula alcanza primero un estado de "adaptación metabólica", en la que el oxígeno juega un papel regulador en el mantenimiento del flujo de ATP mitocondrial, pero no existe un deterioro evidente de la síntesis de ATP (Connett y col, 1990). Esta regulación se puede lograr a través del acoplamiento de PO₂ y la fosforilación y / o el potencial redox, y la magnitud del rango depende de la tasa de producción de ATP (Wilson y col., 1979). Cuando la P_{O₂} declina dentro de este rango de adaptación metabólica, la continua demanda de ATP de la célula debería aumentar la fuerza impulsora de la fosforilación oxidativa mediante el aumento de [ADP] y el estado redox (Connett y col., 1990; Wilson y col., 1979). Medidas simultáneas de tensión de oxígeno y concentración de compuestos de fosfatos de alta energía sugieren que los signos iniciales de fallo en las funciones, tales como disminuciones pequeñas en los valores de pH y en la relación [fosfocreatina]/ [fosfato] aparecen a una PO₂ cortical de 6,8-8,8 mm Hg (Rolett y col., 2000). En algún momento, como la P_{O₂} sigue cayendo, la tasa de síntesis de ATP mitocondrial queda limitada por la disponibilidad de oxígeno (Connett y col., 1990).

Cuando se alcanza este P_{O_2} crítico, la célula debe satisfacer sus necesidades energéticas mediante el aumento de la síntesis de ATP a través de la glucólisis anaeróbica y / o de hidrólisis de fosfatos de alta energía almacenados, es decir, la fosfocreatina (PCr). Numerosos estudios han sido diseñados para identificar la P_{O_2} crítica mitocondrial por debajo del cual el flujo de ATP mitocondrial está alterado (Costa y col., 1997; Rolett y col., 2000; Carreau y col., 2011).

Con pequeñas variaciones entre distintos tipos de células y con una distribución de oxígeno intracelular heterogénea, - diferentes partes de la célula tienen concentraciones de oxígeno diferentes -, el valor para la tensión crítica de oxígeno oscila entre 0,16 y 0,72 mmHg con un valor medio de 0,37 mmHg (Lanza y col., 2010). La respuesta fisiológica a la hipoxia incluye la vasodilatación de arterias y venas del cerebro que aumentan el flujo de sangre y el aporte de oxígeno al cerebro. Los mecanismos responsables de la vasodilatación inducida por la hipoxia no son bien conocidos pero probablemente dependan del NO y de la adenosine (Morikawaa y col., 2012).

Hace casi 90 años, Jean-Francois Heymans y su hijo Corneille Heymans descubrieron el papel de los cuerpos carotídeos como órganos sensores de oxígeno y el reflejo quimiosensorial como un regulador crítico de los sistemas circulatorio y respiratorio, asegurando que cada célula en el cuerpo recibe el O_2 adecuado. En la actualidad sabemos que la detección de O_2 está mediada por un complejo juego de interacción entre el monóxido de carbono y sulfuro de hidrógeno generado por el cuerpo carotídeo. El sensor de O_2 no es uniforme, sino exhibe variaciones interindividuales notables en los seres humanos, lo que tiene consecuencias fisiológicas graves. Hay individuos hipersensibles a la hipoxia lo que puede conducir a la hipertensión arterial y un aumento injustificado en la actividad nerviosa simpática, como la que se observa en la insuficiencia cardíaca congestiva y la apnea del sueño. Las personas hiposensibles a la hipoxia a menudo desarrollan el mal de altura cuando se exponen a gran altitud.

A nivel sistémico la disminución de oxígeno es detectada por quimiorreceptores centrales, localizados en la médula oblongada y quimiorreceptores periféricos localizados en los cuerpos aórticos y cuerpos carotídeos, con los cuerpos aórticos jugando un papel secundario. Los quimiorreceptores periféricos principalmente detectan variaciones en la presión parcial de oxígeno, pero no cambios en el contenido de oxígeno ni en la saturación de hemoglobina, aunque también responden al CO_2 y pH aumentando la ventilación (Kumar y Prabhakar, 2012). Normalmente, la respuesta al CO_2 es el factor más importante en el control de la ventilación. Nervios aferentes del nervio glossofaríngeo viajan desde los cuerpos carotídeos al SNC y desde los cuerpos aórticos por el nervio vago. Durante hipoxia aguda, estos quimiorreceptores liberan un neurotransmisor que activa aferentes sensoriales que hacen sinapsis en el núcleo del tracto solitario (López-Barneo y col.,

2001) donde modulan eferentes simpáticos que inducen respuestas cardio-respiratoria a la hipoxia, tales como un aumento de la tasa respiratoria, aumento de la frecuencia cardiaca, vasodilatación y modulación del flujo sanguíneo cerebral para restaurar la tensión normal de oxígeno en los tejidos (Teppema y Dahan, 2010). Además, las células de la musculatura lisa de la arteria pulmonar también registran los niveles de oxígeno y reaccionan a la hipoxia con una respuesta contráctil que causa vasoconstricción y redistribución del flujo de sangre en los pulmones, un mecanismo que mejora la oxigenación de la sangre (Marshall y col., 1994).

1.2.3. Detección y regulación celular de la tensión de oxígeno

Las células que dependen del oxígeno para el metabolismo, necesitan ser capaces de detectar una disminución de la disponibilidad de oxígeno para entonces activar un programa de respuesta que les ayuda a hacer frente a esa disminución (Wang y Semenza, 1995). Muchos mecanismos celulares diferentes son utilizados para mantener la homeóstasis del oxígeno. Una forma sencilla de hacerlo es disponer de enzimas sensores que utilizan oxígeno para inhibir el programa de respuesta; cuando el suministro de oxígeno disminuye, los sensores se inhiben y el programa de respuesta es entonces rápidamente activado.

Los niveles intracelulares de oxígeno disponible son constantemente monitoreados por una familia de enzimas que requieren oxígeno conocidas como prolil hidroxilasas (PHDs) (Lee y col., 2007). PHDs son los sensores de oxígeno primarias que mantienen los niveles de proteína HIF-1 α baja durante normoxia y permiten que la proteína se estabilice rápidamente tras la hipoxia (Ivan y col., 2001; Jaakkola y col., 2001). En condiciones celulares normales, PHD desestabiliza el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α). La hipoxia afecta la actividad enzimática PHD, estabilizando así HIF-1 α que conduce a la formación de HIF transcripcionalmente activo. HIF activado se une al ADN a través de los elementos de respuesta a la hipoxia (HRE) dentro de genes promotores que desencadenan la expresión de genes que permiten a la célula adaptarse y superar las condiciones de disminución de oxígeno mediante el aumento de transporte de oxígeno, estimular la angiogénesis, y la regulación de la captación de glucosa (Wenger y col., 2005).

La inducción de HIF-1 y la expresión de genes diana de HIF-1 son actualmente consideradas como el regulador maestro de la homeóstasis del oxígeno por controlar el aporte y demanda de oxígeno. El HIF-1 fue purificado y caracterizado por el grupo de Semenza hace 20 años (Wang y Semenza, 1995) y está actualmente considerado como el regulador maestro de la homeóstasis del oxígeno (Semenza 1998). El HIF-1 activa la transcripción de genes que codifican proteínas que median las respuestas de adaptación a la menor disponibilidad de oxígeno. HIF-1 es un dímero en el

que la subunidad HIF-1 β se expresa constitutivamente, mientras que la subunidad HIF-1 α en normoxia es rápidamente degradada por la prolin hidroxilasa que lleva a un aumento de la degradación dependiente de ubiquitinación. Durante los episodios de hipoxia, HIF-1 α es estabilizado y dimeriza con HIF-1 β y activa la transcripción de cientos de genes en cada célula, incluyendo la eritropoietina (EPO) (Jelkmann, 1992), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Forsythe y col., 1996) y enzimas glucolíticos (Semenza y col., (1994) que participan en las respuestas adaptativas que protegen a las células de tensión reducida de oxígeno (Semenza, 2001). Entre la múltiples funciones en las que participan HIFs, en la homeóstasis de oxígeno interviene por una parte regulando el aporte de oxígeno mediante el aumento de la formación de eritropoyetina y la angiogénesis y por otra regulando el consumo de oxígeno mediante el control de la expresión de genes que reprograma el metabolismo celular cambian el metabolismo oxidativo celular a glucolítico (Prabhakar y Semenza, 2015).

2. La hipoxia

El contenido de oxígeno en el aire seco es de 20,94 %. La cantidad de aire en la atmosfera es máximo al nivel del mar y disminuye a medida que aumenta la altitud. El contenido de oxígeno en la atmosfera no es constante, es máximo a nivel del mar y disminuye a medida que nos desplazamos a zonas más altas. La hipoxia es definida como una condición en la que la concentración de oxígeno disponible en el tejido o ambiente tisular es inferior al rango fisiológico. La hipoxia puede ser causada por una reducción de la presión parcial de oxígeno en el ambiente externo, por un transporte reducido de oxígeno por la sangre o por la incapacidad del tejido a usar el oxígeno (Connett y col, 1990). Con la aparición de los globos aerostáticos, los efectos de la hipoxia severa producida por el ascenso a altitudes elevadas, se mostró de manera espectacular incluyendo varias muertes. Destaca por su impacto popular las consecuencias del ascenso en globo aerostático hasta 7500 m llevado a cabo por tres aeronautas franceses, Tissandier, Crocé-Spinel y Sivel a bordo del Zénith en 1875 en las proximidades de París (Francia), que terminó con la muerte de Crocé-Spinel y Sivel.

El fisiólogo francés Paul Bert, en su publicación *La Pression Barométrique* en 1878, era el primero en identificar claramente que la disminución de la PO_2 como responsable de los efectos deletéreos causados por la altitud. En sus experimentos Bert utilizó cámaras donde expuso los animales a bajas presiones de aire (hipoxia hipobárica) y a mezclas de gases a presión normal pero con baja concentración de oxígeno (hipoxia normobárica). El uso de los tipos de hipoxia le permitió demostrar que la variable crítica era la PO_2 .

2.1. Tipos de hipoxia

En general se reconocen 4 tipos principales de hipoxia. *Hipoxia hipobárica* es una disminución en la fracción de oxígeno inspirado debido a hipoventilación por depresión respiratoria o a una disminución en la tensión de oxígeno ambiente (por ejemplo estancia en altitud). *Hipoxia anémica* es una disminución en la cantidad de hemoglobina que está disponible para la unión de oxígeno, debido a la pérdida de sangre, producción de glóbulos rojos reducido, un defecto genético de la hemoglobina o envenenamiento por monóxido de carbono. *Hipoxia estancada* se caracteriza por el flujo de sangre baja, debido a la vasoconstricción local o disminución del gasto cardíaco. *Hipoxia histotóxica* es causado por envenenamiento de enzimas oxidativas; por ejemplo, por cianuro.

Los animales de acuerdo con sus respuestas metabólicas a la hipoxia se clasifican en (i) oxirreguladores, cuyo metabolismo exhibe una alta tasa obligatoria de consumo de energía, u (ii) oxiconformadores, cuyas demandas de energía disminuyen con la disminución de la disponibilidad de O₂. Estas clasificaciones generales también se aplican a los tejidos y órganos individuales, con el cerebro considerado generalmente como el más órgano sensible a la hipoxia y el músculo esquelético entre las más tolerantes a la hipoxia.

La característica más protectora de la supervivencia en condiciones O₂ limitantes es una reducción regulada del metabolismo energético (Prabhakar y Semenza, 2015). La eritropoyesis y la angiogénesis inducido por la hipoxia no aumentan de forma inmediata el aporte de oxígeno, pues requieren días a semanas para aumentar el número de glóbulos rojos o generar nuevos vasos sanguíneos suficientes para mejorar la oxigenación del tejido. Sin embargo, respuestas que llevan a una reducción del consumo de O₂ ocurren en tiempos mucho más cortos, minutos a horas. En casos de severa limitación de O₂, las células más excitables de mamíferos no pueden seguir respondiendo a las demandas de energía de los sistemas de transporte de iones activos, lo que lleva a un rápido agotamiento de sustrato fermentable, incapacidad de la membrana y la muerte celular. Sin embargo, en ciertos vertebrados inferiores, en recién nacidos y en mamíferos de buceo, la desestabilización de la membrana inducida por la hipoxia observada en mamíferos adultos o bien tiene un desarrollo lento o no se produce con la consiguiente reducción de los costes energéticos de ATPasas que mantienen el equilibrio iónico (Hochachka y col., 1996).

2.2 La hipoxia respiratoria

La hipoxia respiratoria, es definida como una reducción en el contenido de oxígeno en la atmósfera que causa un estado de déficit en la disponibilidad de oxígeno en la sangre y en los tejidos corporales. Aquí utilizamos el término de hipoxia respiratoria para distinguirla de otras formas de hipoxia como las debidas a un transporte reducido de oxígeno por la sangre, a una

disminución del flujo sanguíneo que compromete el aporte de oxígeno al tejido o a la incapacidad del tejido a utilizar el oxígeno como ocurre en enfermedades pulmonares crónicas y en trastornos como el síndrome de apnea durante el sueño (Somers y col., 1995).

En la clínica, normalmente hipoxia cerebral se produce normalmente en el contexto de la isquemia, definida como un déficit de oxígeno en el tejido asociada a una disminución del flujo sanguíneo. La isquemia normalmente implica disminución del flujo en el tejido isquémico mientras que la hipoxia respiratoria implica reducción en el contenido de oxígeno y aumento del flujo (Pearingen y col., 1996). Clínicamente, esta distinción es generalmente ignorada y los términos hipoxia e isquemia se utiliza generalmente como sinónimos. A diferencia de la hipoxia, en el que las células pueden mantener los niveles de ATP por el metabolismo cambiando del metabolismo oxidativo dependiente del oxígeno a un metabolismo glucolítico, la isquemia implica además una reducción en el suministro de glucosa. La glucosa es el sustrato energético obligatorio para el cerebro; en un cerebro intacto, astrocitos captan la glucosa y la utilizan para la glucólisis, y hacen de lanzadera de piruvato y lactato para las neuronas, que luego utilizan estos sustratos para la fosforilación oxidativa (Magistretti y col., 1999). Más recientemente se ha demostrado que los cuerpos cetónicos se pueden utilizar también por el cerebro como sustratos de energía, y de hecho son absorbidos por el cerebro a un ritmo mayor durante la isquemia cerebral (Prins, 2008). No obstante, en el núcleo isquémico donde el oxígeno y el suministro de glucosa son más bajos, el ATP puede ser gravemente agotado en cuestión de minutos; en un modelo de rata de isquemia del cerebro anterior, dentro de los 10 minutos la concentración de glucosa se redujo de 3,64 a 0,21 mM / g y la concentración de ATP se redujo de 2,64 a ,18 μ M / g, con aumentos correspondientes en lactato y AMP (Prins, 2008).

La hipoxia respiratoria puede ser de tipo *hipobárica* (disminución de la PO_2 causada por una disminución natural o artificial de la presión del aire asociada a disminución en la presión barométrica), o *normobárica* (baja concentración de oxígeno en el aire inspirado a una presión barométrica normal). Hipoxia (hipobárica) ambiental o altitud ocurre cuando al ascender a altitudes relativamente elevadas (montañas o vuelos) con la presión barométrica disminuyendo con la altitud. Hipoxia hipobárica puede obtenerse de forma artificial (altitud simulada) mediante cámaras hipobáricas de bajas presiones. Hipoxia normobárica puede ser obtenida usando varias tecnologías disminuyendo la concentración de oxígeno en el aire inspirado. En función del tiempo de exposición a la hipoxia, distinguimos: Entre los tipos de hipoxia respiratoria, en función de tiempo de exposición destacan:

2.2.1. “*Hipoxia continua aguda*” (HA)

La HA esta conceptualizada como exposición puntual a la hipoxia durante un corto periodo de tiempo (minutos, horas o pocos días). Está implicado sobre todo el sistema nervioso (SN) y ciertas respuestas fisiológicas, como aumentos de frecuencia respiratoria, aumento de frecuencia cardíaca o retención de líquidos (mala aclimatación). Los animales que dependen de la ventilación pulmonar para su suministro de oxígeno responden a la hipoxia aguda, que resulta de una disminución en la PaO₂ en la sangre arterial, aumentando su ventilación pulmonar (Teppenema y Dahan, 2010). El aumento inicial de la ventilación en hipoxia es iniciado por los cuerpos carotideos donde las células que detectan el oxígeno (células glomus o tipo I) aumentan su actividad en hipoxia (Teppema y Dahan, 2010). Otro medio que los mamíferos pueden utilizar para preservar la homeostasis de oxígeno en la hipoxia aguda es optimizar y disminuir la tasa de metabolismo aeróbico, lo que reduce la demanda de oxígeno y al mismo tiempo aumentar la producción de ATP a partir del metabolismo anaeróbico (glucólisis) (Raichle, 2015).

2.2.2. “*Hipoxia continua crónica*” (HC)

La HC ocurre cuando la exposición a la hipoxia es prolongada, (días, semanas, meses, años). Normalmente la exposición a este tipo de hipoxia lleva a la inducción de respuestas adaptativas y constante que son iniciadas y mantenidas por factores de transcripción que regulan la expresión de muchos genes. Se da en poblaciones que viven normalmente en altitudes elevadas (Andes, Himalya, Karakorum). Alrededor del 25% de la superficie terrestre son montañas y el 12 % de la población mundial vive en estas regiones.

2.2.3. “*Hipoxia intermitente*” (HI)

La HI es definida como un tiempo de exposición a hipoxia con una duración de minutos a días seguido con exposición a normoxia que se repite varias veces. El término hipoxia intermitente puede significar cosas diferentes para diferentes investigadores. Dependiendo de lo que significa y en qué contexto se produce, el efecto de la HI puede ser beneficioso o perjudicial. Aquí el término “hipoxia intermitente” indica periodos repetidos de varias horas de hipoxia intercalados con periodos de varias horas de normoxia” que se repiten varios días Powell y García, 2000).

La HI es frecuentemente usada como una estrategia alternativa a la aclimatización mediante largas estancias en altitud y para inducir respuestas adaptativas que mejoran los resultados deportivos en atletas (Wilber 2007). Exposición a HI puede ser conseguida mediante el empleo de cámaras hipobáricas o normobáricas. Este método alternativo a estancias prolongadas en altitud ha

sido empleado tanto para conseguir favorecer el rendimiento en atletas (Katayama y col., 1998; Rodríguez y col., 1999) y con fines terapéuticos en el tratamiento de arritmias cardíacas (Meerson y col., 1987). Sin embargo, como la HI afecta al cerebro no es bien conocido (Costa y col., 2013).

En función de la duración de los episodios de hipoxia, la hipoxia intermitente puede ser aguda (HIA) cuando la duración de los episodios es del tipo de la hipoxia aguda, o crónica (HIC) cuando la duración de los episodios de hipoxia es del tipo de la hipoxia crónica. Este tipo de hipoxia se da en gente que vive en países montañosos como América del Sur y Asia Central donde una parte importante de la población regularmente por motivos profesionales ha de desplazarse entre altitudes bajas y altas. Trabajadores de la mina Collahuasi en el norte de Chile viven en Iquique al nivel del mar y trabajan a una altitud de 4500 m y duermen a una altitud de 3800 m. Normalmente siguen ciclos de una semana de trabajo en la mina seguida de una semana al nivel del mar con un patrón que se repite durante muchos meses y años. A ellas hay que añadir los millones de turistas que visitan áreas de altitud elevada. HC también ocurre en enfermedades pulmonares crónicas mientras que la hipoxia intermitente crónica (HIC) en patologías como el síndrome de apnea obstructiva en el sueño (Somers y col, 1995) aunque ha sido sugerido que el síndrome de apnea debería ser considerado como distinto de las otras condiciones de HI (García y col, 2000). Los mecanismos celulares y moleculares que están en la base del efecto de la hipoxia constante o intermitente no son bien conocidos. Aunque la exposición intermitente a hipoxia respiratoria induce adaptaciones respiratorias y cardiovasculares (Katayama y col., 1998; Rodríguez y col., 1999), también la hipoxia puede inducir un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) y consecuentemente, aumentar el riesgo de causar un estado de estrés oxidativo (Bailey y col., 2009; Sharma y col., 2011).

2.3. Ventajas del uso de las cámaras en el estudio de los efectos de la hipoxia

El efecto de la altitud, por la repercusión que tiene en la salud ha sido y sigue siendo objeto de muchas investigaciones. Sin embargo, para conocer los efectos de la hipoxia, las estancias en altitud tienen dificultades, pues en esas condiciones, los efectos no son exclusivos de la hipoxia. Pronto se acuñó el término “high altitude deterioration” usado por expediciones al Everest para señalar el deterioro físico y mental como resultado de una estancia prolongada en altitud. Este deterioro es atribuido a deshidratación, hambre, fatiga física, alteración del sueño y frío. El empleo de cámaras permite estudiar el efecto de la hipoxia al margen de los otros factores que ocurren en “high altitude”.

Los estudios sobre la hipoxia se llevan a cabo mediante la reducción de la presión ambiente parcial de oxígeno (PO_2), ya sea mediante la reducción de la presión barométrica (hipoxia

hipobárica) o mediante la reducción de la fracción de O₂ (hipoxia normobárica) en la que prevalece la presión barométrica (P_B). Existe una cierta controversia acerca de si ambos tipos de hipoxia inducen las mismas respuestas (BOOK West, p.56).

2.4. Efectos fisiológicos de la hipoxia

La hipoxia inicia una serie de respuestas fisiológicas a lo largo de una escala de tiempo de minutos a días, meses para mantener la homeostasis del oxígeno. El hombre y otros mamíferos responden a la hipoxia con un amplio rango de respuestas adaptativas tanto a nivel sistémico, como tisular y celular para asegurar una estrecha regulación de la homeóstasis del oxígeno y evitar riesgos metabólicos (Semenza, 2012). Estas adaptaciones pueden resumirse como sigue: 1) Aclimatización a la altitud (ventilación, respuesta ventilatoria hipóxica, saturación de oxígeno arterial; 2) respuestas hematológicas (EPO y eritropoyesis, angiogénesis); 3) efectos sobre el rendimiento físico y capacidad aeróbica (rendimiento en deportistas, umbral ventilatorio, VO_{2 max}) (Bunn y Poyton, 1996; Rodriguez y col., 1999; García y col., 2000).

Las adaptaciones a la hipoxia dependen de múltiples factores (Hochachka, 1998) que hacen que la investigación en este campo sea particularmente compleja. Tipos de células diferentes y formas de hipoxia diferentes (Hochachka y col, 1996) muestran respuestas adaptativas heterogéneas a la hipoxia. A partir de los JJ.OO celebrados en 1968 México D.F., debido a las ventajas que inducen las adaptaciones fisiológicas para la realización de varias actividades deportivas, la exposición a la hipoxia respiratoria mediante la estancias en altitud han alcanzado un importante interés, con centros como Colorado Altitud Training (USA), Iten (Kenia), Navacerrada (España) entre otros, que cada año son visitados por miles de atletas para mejorar su condición fisiológica especialmente la resistencia (*indurance*), aumentar la fuerza y la velocidad, la resistencia a la fatiga y mejorar la recuperación. Más recientemente, los efectos de la altitud han sido inducidos usando cámaras hipobáricas (Katayama y col., 1998; Rodriguez y col., 1999). Sin embargo, junto los efectos beneficiosos, la hipoxia respiratoria, cuando lleva a una disminución severa de oxígeno tiene efectos deletéreos que pueden llevar a la muerte.

Cada vez es mayor el número de personas que en algún momento de su vida están expuestas durante periodos de varios días o semanas a ambientes con una disponibilidad de oxígeno reducida. Incluyen a personas por motivos de trabajo, deportistas que realizan estancias en altitud, personas que en vacaciones realizan *trekking* en regiones por encima de los 4000 m., expediciones a cumbres por encima de los 6000 m. La baja disponibilidad de oxígeno que hay en la atmósfera en esas condiciones, no puede ser tolerada por el cerebro por periodos de tiempo largo. Problemas médicos relacionados con la altitud están ganando mayor atención en la medida que aumenta el

número de personas que trabajan, viajan y viven en ambientes de mayor altitud (Maa, 2010). En los Estados Unidos, debido a los numerosos núcleos turísticos para la práctica de esquí, existen grandes poblaciones que viven de modo permanente en altitud elevada, entre 2400 y 3700 m (Estado de Colorado). A ellos hay que añadir 22,5 millones de personas que visitan destinos turísticos de Colorado cada año y muchos pierden días de vacaciones debido a los dolores de cabeza graves (headaches) de altitud altas graves (Semenza, 2009). Cuando se tiene en cuenta a estos grandes números, las enfermedades relacionadas con la altitud tienen un impacto médico, así como fiscal, significativo.

Se considera altitud moderada entre 1500 y 2400 m, y altitud elevada entre 2400 y 3700. Por encima de los 5000 m hablamos de altitud extrema. A altitudes entre 3000 y 5000 m, investigadores en el Mauna Kea Observatory en Hawaii, mineros en las minas andinas en Chile, y trabajadores en el Qinghai-Tibetan Railway en China frecuentemente presentan un abanico de enfermedades asociadas con la altitud. La hipoxia está en la raíz del espectro de las enfermedades asociadas con la altitud, y debido a las demandas de oxígeno basales del cerebro, alteraciones clínicas debidas a hipoxia hipobárica típicamente tienen presentaciones neurológicas. (Semenza, 2009).

3. Hipoxia Cerebral

El hombre, como la mayor parte de mamíferos, tiene poca tolerancia a la hipoxia severa ($\text{FiO}_2 < 8\% \text{ O}_2$) y sus células y tejidos excitables son normalmente afectados por la exposición prolongada a la hipoxia. De todas las partes del cuerpo, el cerebro es el más vulnerable a la hipoxia. Estancias en localidades por encima de 3000 m o ascensos en globos aerostáticos a altitud elevada es frecuente que vayan acompañadas de alteraciones en las funciones neurológicas, incluyendo los sentidos especiales tales como la visión, funciones superiores como la memoria, en el comportamiento con cambios en el humor así como problemas en el control motor (Hamilton y col., 1991). El cerebro de los mamíferos es un órgano que depende de un continuo y adecuado aporte de oxígeno para mantener su integridad estructural y funcional. Aunque el peso del cerebro humano es sólo alrededor de 2% del peso corporal total, su alta actividad metabólica utiliza 20% de oxígeno y 25% de la glucosa consumida por todo el cuerpo (Zauner y col., 2002). En parte, la vulnerabilidad del tejido cerebral a la hipoxia refleja sus altas demandas metabólicas. La alta demanda de energía la obtiene por oxidación de la glucosa casi exclusivamente de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Esto hace al cerebro ser un órgano muy dependiente del aporte de oxígeno y glucosa. El funcionamiento adecuado de las células cerebrales depende de un suministro abundante y continuo de oxígeno. Incluso con tales altas demandas metabólicas, no hay almacenamiento de oxígeno en el tejido cerebral, y sólo las reservas limitadas de compuestos de fosfato de alta energía

y sustratos de hidratos de carbono están disponibles. Más de 90% del oxígeno consumido por el cerebro es utilizado por la mitocondria para generar ATP. En reposo, alrededor del 40% de la energía cerebral se utiliza para mantener y restaurar gradientes iónicos a través de la membrana celular (Rolfe y Brown, 1997; Zauner y col., 2002). El mantenimiento de un entorno intracelular homeostático requiere la redistribución de los iones Na^+ y K^+ a través de sistemas de bombeo dependientes de ATP como el Na^+/K^+ -ATPasa, (Figura 1) que puede consumir 20-80% de tasa metabólica en reposo de la célula dependiendo de la magnitud de su actividad eléctrica (Rolfe y Brown, 1997).

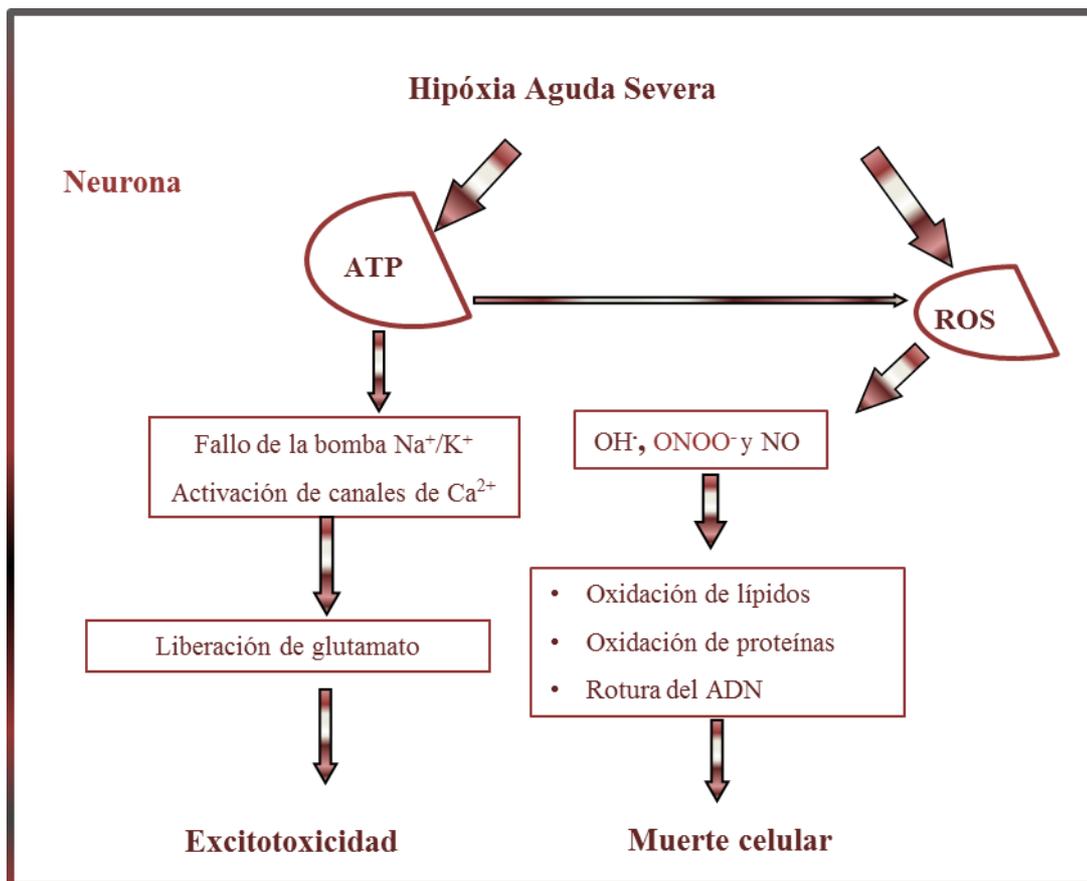


Figura 1: Mecanismo de hipoxia aguda severa y los factores involucrados en llevar la neurona a la excitotoxicidad y/o muerte celular.

3.1. Mecanismos moleculares inducidos por la hipoxia en las neuronas

En condiciones fisiológicas, la fosforilación oxidativa es un mecanismo altamente eficiente para la producción de ATP en un proceso dependiente de la utilización de O_2 como aceptor terminal de electrones en el complejo IV de la cadena respiratoria. En condiciones de hipoxia severa (Fracción inspirada de oxígeno [FiO_2] <8% de O_2), el suministro de oxígeno al cerebro por debajo del nivel de la “tensión de oxígeno crítica” reduce la fosforilación oxidativa, que lleva a una

disminución de la producción de ATP celular, que causa una disminución rápida en la concentración celular de ATP (Martin y col., 1994; Katsura y col., 1994) que conduce a una extensa depresión de la transmisión sináptica y al aislamiento electrofisiológico de las neuronas (Martin y col., 1994; Erecinska y Silver, 2001). La disminución de la cantidad de ATP es el origen del inicio de los procesos celulares que incluyen: desequilibrio iónico, la liberación de exceso de glutamato en el espacio extracelular (Figura 2), un aumento importante en el calcio intracelular que a su vez activa múltiples vías intracelulares que finalmente pueden causar la muerte de neuronas (Katsura y col., 1994; Choi, 1998; Coyle y Puttfarcken, 1993).

A medida que el estímulo hipóxico es sostenido y la deficiencia de O₂ continúa, el suministro de ATP es insuficiente para mantener la actividad de las bombas de iones dependientes de ATP, como la Na⁺/K⁺-ATPasa. Esto conduce un cambio del equilibrio electroquímico con la pérdida de los gradientes iónicos del Na⁺ y el K⁺ y a una despolarización rápida y generalizada de la membrana celular.

Dos consecuencias principales han sido descritas como consecuencia de la caída de los niveles de ATP causada por la hipoxia: 1) Una despolarización masiva que lleva a una liberación excesiva de neurotransmisor al espacio extracelular y 2) Un aumento de la producción de radicales libres. (Erecinska y Silver, 2001)

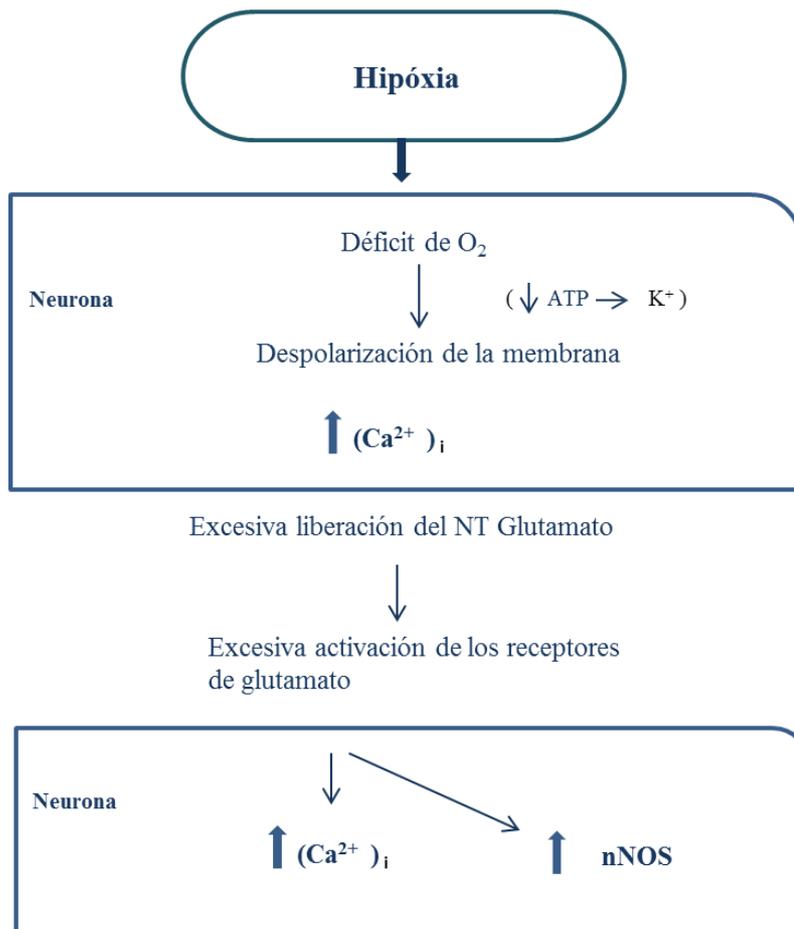


Figura 2: La hipoxia induce alteración de la homeostasis del Ca⁺⁺.

3.1.1. Excitotoxicidad

La acumulación excesiva de glutamato en el espacio extracelular causa una activación excesiva de los receptores de glutamato en las neuronas vecinas. La apertura de un número muy elevado de receptores de glutamato lleva a la acumulación de Ca⁺⁺ en el citosol en las neuronas (Sattler y Tiamanski, 2000; Orrenius y col., 2003). El aumento de los niveles de Ca⁺⁺ intracelular inicia una cascada de reacciones que pueden causar la muerte neuronal (Lipton 1999; Nicholls, 2009; Szydlowska y Timiansky, 2010). Al proceso por el que el exceso de glutamato causa la muerte de las neuronas es conocida como excitotoxicidad (Rothman y Olney, 1986). El calcio juega un papel crítico en la cascada excitotóxica pues la eliminación de Ca⁺⁺ del medio extracelular (Choi, 1987) o evitando la captación de Ca⁺⁺ por la mitocondria (Stout y col., 1998) protege a las neuronas de la lesión excitotóxica.

Los mecanismos excitotóxicos que conducen a la muerte de neuronas son complejos, pero principalmente implican la formación de estrés oxidativo (Siesjo y col., 1995; Pelligrini-Giampietro y col., 1990; Oh y Betz 1991) la disfunción mitocondrial (Shinder y col., 1996; Nicholls y Budd, 1998) y la participación de diversos factores de transcripción como activadores de la expresión de genes (Akins y col., 1996; Clemens, 2000). Todos estos mecanismos actúan sinérgicamente y pueden dañar proteínas celulares (Berlett y Stadtma, 1997), lípidos (Sakamoto y col., 1991) y el ADN (Hayashi y col., 1999; Cui y col., 2000) con el consiguiente deterioro de la arquitectura celular y la señalización, que lleva a la muerte neuronal por necrosis, apoptosis o ambos, dependiendo de la severidad y duración de la hipoxia y de la velocidad relativa de cada proceso (Bonfoco y col., 1995; Nicotera y col., 1999; Ünal-Cevik y col., 2004).

Los estudios acerca de los mecanismos que resultan en la muerte celular como consecuencia de la excitotoxicidad del glutamato muestran el papel esencial del Ca^{++} en la muerte celular resultante de la activación receptor de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDAR) crónica. Aunque virtualmente todos los miembros de la familia de receptores de glutamato se considera que participan en la excitotoxicidad (Choi, 1987), el receptor de glutamato NMDARs está considerado como el principal mediador de la muerte neuronal causada por la excitotoxicidad (Arudine y Timiansky, 2003; Waxman y Linch, 2005). Los NMDARs están localizados en áreas sinápticas y extrasinápticas en la membrana de la neurona. Estas diferentes localizaciones en la membrana celular han sido consideradas como un factor determinante en la excitotoxicidad (Hardingham y col., 2002; Sattler y col., 2000; Léveillé y col., 2008). Dependiendo de su localización en la membrana celular, la activación de NMDARs tiene efectos radicalmente diferentes. Mientras la actividad sináptica de NMDAR es necesaria para la supervivencia neuronal, la actividad de NMDAR extrasináptica está implicada en la muerte neuronal (Hardingham y col., 2002; Sattler y col., 2000). Sin embargo, también se ha postulado que las diferencias aparentes en la excitotoxicidad mediada por el NMDAR podría ser debido a diferencias en la composición molecular entre el NMDAR sináptico y el NMDAR extrasináptico, más que a la ubicación de los receptores (Figura 2). En los cerebros adultos, NMDARs situados en las sinapsis contienen predominantemente el subtipo NR2A mientras que NMDARs extrasinápticos predominantemente contienen el subtipo NR2B (Liu y col., 2007; Tu y col., 2010).

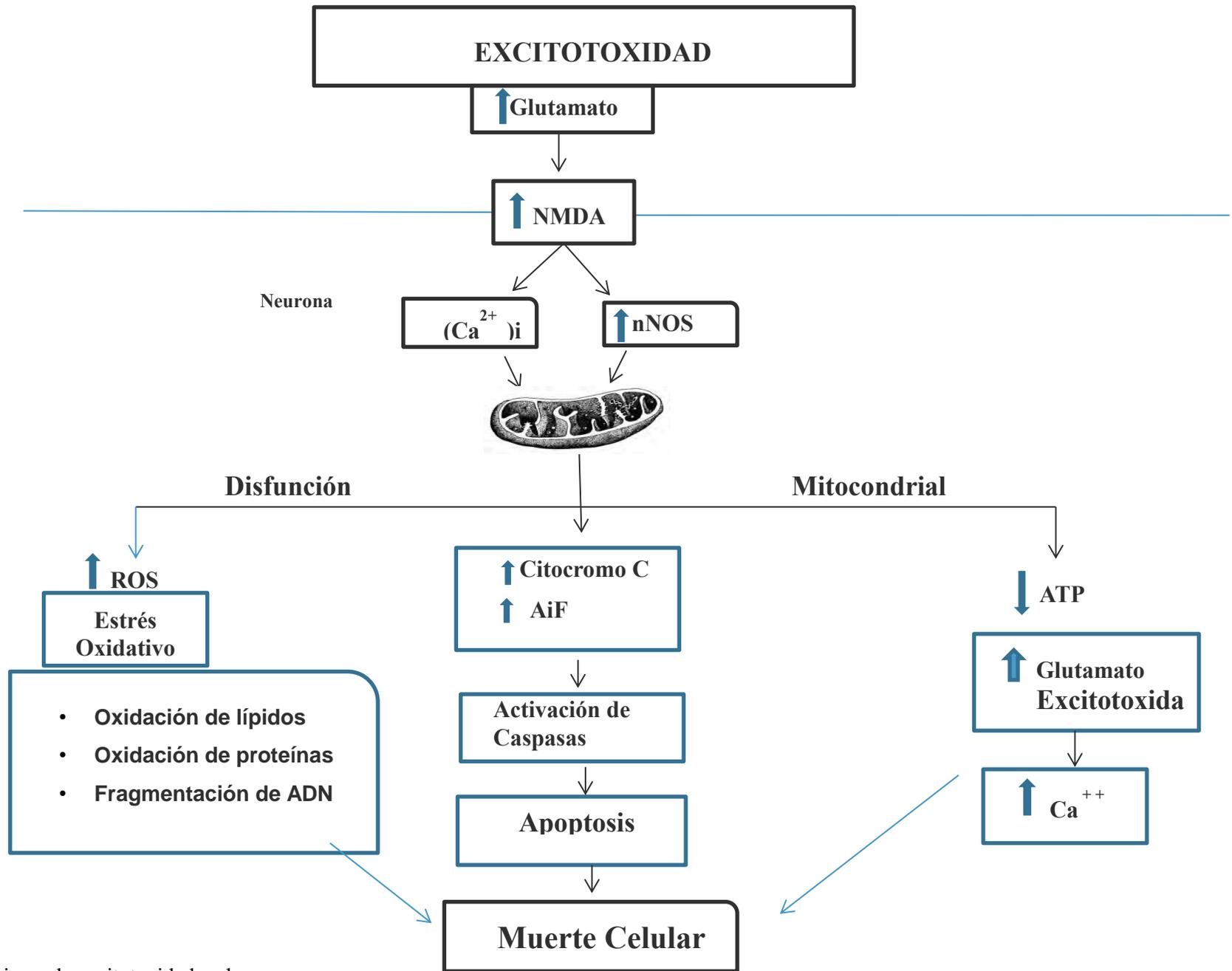


Figura 3: Mecanismo de excitotoxicidad en la neurona.

La activación continua de un gran número de receptores de NMDA lleva a la aumento de calcio intracelular. Cambios en la concentración de Ca^{2+} controlan una variedad de procesos desde proliferación y diferenciación celular a funciones específicas de diferentes células adultas y tejidos, incluyendo toda la vía de la muerte celular programada (Sattler, 2000). Estos eventos incluyen el estrés oxidativo, la despolarización de la membrana mitocondrial y la activación de caspasas, que llevan a la muerte de la neurona (Banasiak y col., 2000; Green y Kroemer, 2004).

4. Estrés Oxidativo

Uno de los efectos más importantes atribuidos a la excitotoxicidad es causar estrés oxidativo, redefinido como “una alteración en el equilibrio de la capacidad antioxidante y prooxidante a favor de la primera, asociado con una interrupción del circuito redox y con daño molecular en la célula” (Jones, 2006). Estrés oxidativo describe una condición en la que la capacidad antioxidante celular es insuficiente para mantener los niveles de radicales libres, los principales ejecutores del estrés oxidativo, por debajo del umbral tóxico. Esto puede ocurrir por una producción excesiva de radicales libres, por la pérdida de la capacidad antioxidante o por ambos. Cuando la producción de oxidantes excede la capacidad a la que la actividad antioxidante endógena puede neutralizar a los oxidantes, estos pueden causar daños a las estructuras de proteínas, lípidos y ADN que lleva al deterioro de la arquitectura estructural celular y finalmente a la muerte celular (Halliwell, 2006, Avery, 2011). Actualmente el estrés oxidativo aparece implicado en la principales patologías neurodegenerativas, entre otras el Parkinson, Alzheimer, ictus (Roberts y col., 2009). La hipoxia respiratoria induce estrés oxidativo en el cerebro (Rauca y col., 2000; Maiti y col., 2006)). La intensidad del estrés es proporcional al tiempo de exposición y a la severidad de la hipoxia. Ratas sometidas a una exposición de 20 minutos con una hipoxia de $P_a\text{O}_2$ a 20 mmHg no causaba un aumento del glutamato extracelular en el cerebro ni se observan daños morfológicos. Así, la hipoxia sin isquemia parece bien tolerada por el cerebro (Pearigen, 1996). Sin embargo, otros trabajos demuestran que hipoxias severas causan excitotoxicidad en las neuronas (Maiti y col., 2006, Himadri et al., 2010).

4.1 Formación de ROS

En condiciones fisiológicas el mantenimiento redox es resultado de un equilibrio entre la capacidad antioxidante (en las neuronas, principalmente la actividad de la

superóxido dismutasa (SOD) y del sistema glutatión) y la capacidad pro-oxidante celular (producción de radicales libres) (Imlay, 2008). Los radicales libres pueden ser definidas como moléculas o fragmentos moleculares que contienen uno o más electrones desapareados en orbitales atómicos o moleculares (Gutteridge y Halliwell, 2000; Lewen y col., 2000). Este electrón no apareado (s) por lo general da un grado considerable de la reactividad a la de los radicales libres. Radicales derivados de oxígeno y radicales derivados de óxido nítrico, conocidas como especies de oxígeno reactivas (ROS) y especies de nitrógeno reactivas (RNS), representan la clase de especies de radicales más importante generados en los sistemas vivos que intervienen en el daño celular causado por el estrés oxidativo (Halliwell, 2006; Valko y col., 2007).

Tres mecanismos distintos generan ROS en las neuronas y contribuyen a la muerte celular durante la hipoxia (Abramov y col., 2007). En las células, las principales fuentes de ROS son la cadena respiratoria mitocondrial y los enzimas NAD(P)H oxidasa y xantina oxidasa (Avry, 2011). La mitocondria es la principal fuente fisiológica de ROS (Boveris y Chance, 1973; Turrens, 2003; Adam- Vizi, 2005) y es al mismo tiempo objetivo de los ROS (Martindale y Holbrook, 2002; Langley y Ratan, 2004). El complejo NADPH oxidasa que produce superóxido ($O_2^{\cdot-}$) en condiciones de normoxia, se ha implicado en la generación de ROS durante la isquemia y la reperfusión (Walder et al., 1997). Otra fuente de generación de ROS, la xantina oxidasa (XO), también ha demostrado ser un importante productor de radicales libres durante la isquemia-reperfusión (Manning et al, 1984). Inhibidores de la xantina oxidasa atenúan la lesión cerebral (Palmer et al., 1990).

Desde 1977, con la demostración de que el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) la guanilato ciclasa y la formación del segundo mensajero, el GMPc (Mittal y Murad, 1977) la formación de ROS es parte del metabolismo normal en el que participa en importantes funciones fisiológicas como por ejemplo en la defensa contra agentes infecciosos, en la función de sistemas de señalización celular y en la inducción de la respuesta mitógena (Dröge 2002; Hansen 2006; Valko y col., 2007).

En condiciones fisiológicas, durante la fosforilación oxidativa en las mitocondrias un número reducido de electrones, abandona la cadena de transporte electrónica (ETC) mitocondrial y reaccionan con el oxígeno para formar radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) un miembro del grupo de ROS, que es rápidamente convertido en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ya sea espontáneamente, particularmente a pH bajo, o catalizado por el enzima superóxido dismutasa (Boveris y Chance, 1973). A su vez, el

H_2O_2 puede ser, por la reacción de Haber-Weiss, convertido en el radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), el radical libre más reactivo producido por los sistemas biológicos (Nappi y Vass, 2000; Halliwell, 2001) o reducido a agua por la catálisis de GSH peroxidasas.

La formación de superóxido y el peróxido de hidrógeno es apenas detectable en mitocondrias que respiran normalmente (sin inhibición) (Staniek y Nohl, 2000; Steirre y col., (2002). Sin embargo, una reducción de la disponibilidad de oxígeno por la hipoxia produce una acumulación de equivalentes reductores en la cadena de transporte electrónico mitocondrial que lleva a favorecer la producción de ROS y consecuentemente estrés oxidativo y apoptosis (Chandel y col., 1998; Bell y col., 2007; Guzy y Schumaker, 2006). Actualmente la producción de radicales libres por NAD(P)H oxidasa y XO han sido propuestas como fuentes importantes del aumento de radicales libres en la hipoxia (Pearigen, 1996; Valko y col., 2007). Como conclusión, se puede decir que la producción de niveles bajos de ROS son una señal de que la función mitocondrial está intacta, mientras que el aumento de la producción de ROS, debida a la reducción o disponibilidad fluctuante de O_2 , es una señal de que la célula está en riesgo de daño oxidativo (Semenza, 2009).

El estrés oxidativo es también asociado con la presencia de altos niveles de radicales libres derivados del óxido nítrico (RNS). El NO es un radical libre que juega un papel clave tanto en procesos fisiológicos normales (Moncada y col., 1991; Bredt y Snyder, 1994) y en estados de enfermedad (Moncada y col., 1991; Heales y col., 1999). Bajo ciertas circunstancias, NO puede ser neurotóxico. En respuesta a la hipoxia, la producción de NO en el cerebro aumenta dramáticamente debido a la acción de la activación de la NOS neuronal y de las isoformas inducibles de la NOS (Bolaños y Almeida, 1999). NO tiene una gran afinidad hacia el anión superóxido en un proceso llamado reacción de Haber-Weiss, que combina H_2O_2 y $\text{O}_2^{\cdot-}$ para formar el radical hidroxilo y el peroxinitrito (ONOO^-) (Bolaños y Almeida, 1999). Estos dos últimos radicales son los radicales libres más reactivos producidos en sistemas biológicos. ONOO^- se genera en niveles altos durante la hipoxia (Lipton, 1999) y contribuye fuertemente a daño cerebral y la peroxidación lipídica de la membrana (Bolaños y Almeida, 1999). En las sinapsis, los NMDRs activados por glutamato, principalmente a través de las subunidades NR1 y NR2, interactúan con la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (Sattler y col., 1999). La activación de nNOS por NMDRs lleva a la producción excesiva de óxido nítrico, que si bien en condiciones fisiológicas es un segundo mensajero intracelular, en cantidades mayores es un sustrato para la producción de

radicales libres como peroxinitritos que promueven el daño celular (Bolaños y Almeida, 1999).

4.2 Antioxidantes biológicos

Halliwell and Gutteridge, en 1989, definieron el concepto de antioxidante como “aquellas sustancias que encontrándose a concentraciones más bajas respecto a la de un sustrato oxidable (biomoléculas), retarda o previene la oxidación de dicho sustrato”.

Para el mantenimiento del equilibrio redox celular, las células disponen de un sistema antioxidante. La continua producción de radicales libres de oxígeno por el metabolismo aerobio celular hace necesaria la existencia de mecanismos antioxidantes endógenos, de tipo enzimático y no enzimático, para proteger las células del estrés oxidativo y mantener así la homeostasis celular. Las células han desarrollado tanto enzimática como no-enzimática mecanismos para protegerse de los efectos tóxicos de los oxidantes. Mecanismos enzimáticos que incluyen SOD, catalasas y glutatión peroxidasa (GPx) y los antioxidantes no enzimáticos que incluyen al glutatión, ascorbato y α -tocopherol (vitamina E) están entre los sistemas antioxidantes celulares más importante. En condiciones fisiológicas, antioxidantes y oxidantes operan juntos para mantener la homeóstasis de los radicales libres. De los tipos principales de ROS - radical superóxido, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo-, sólo existen enzimas detoxificadoras para neutralizar los dos primeros. No obstante, eliminando estos dos radicales libres se limita la formación del radical hidroxilo.

4.2.1. Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa fue descrita por primera vez por los investigadores McCord y Fridovich en 1969. Se encarga de eliminar el radical superóxido catalizando su dismutación para generar peróxido de hidrógeno y oxígeno, siendo esta reacción cuatro veces más rápida que la dismutación no enzimática de este radical (Fridovich, 1978; Halliwell, 1991).

SOD



Es una enzima que presenta varias isoformas repartidas por los diferentes compartimentos celulares, su localización preferentemente es citosólica, aunque también se ha detectado su presencia en otros orgánulos, como la mitocondria o los glicosomas. Químicamente se caracteriza por ser capaz de incluir ciertos cationes metálicos en su estructura. Tradicionalmente las SODs se han clasificado en tres tipos

de acuerdo con el cofactor metálico al que aparecen unidas, los metales que contienen o su localización celular: Cu-ZnSOD (SOD1), MnSOD (SOD2), EC-SOD (SOD3) (Perry et al., 2010).

La enzima CuZnSOD (SOD1), de localización citosólica, es un homodímero de 32kDa, con un átomo de cobre y otro de zinc en cada una de sus subunidades. El átomo de cobre parece ser responsable de la actividad catalítica mientras que el átomo de zinc tendría una función estabilizadora de la estructura (Bergendi et al., 1999).

La enzima MnSOD (SOD2), se localiza en la mitocondria y contiene cuatro subunidades idénticas con un átomo de manganeso en cada una de ellas. El estrés oxidativo conduce a la inactivación o disminución de la actividad de esta enzima, debido a la acumulación del anión superóxido a nivel de la mitocondria, y más tarde, a la muerte celular de este orgánulo (Keller et al., 1998; Lee and Wei, 2007).

La enzima EC-SOD (SOD3), de localización extracelular, es una glicoproteína tetramérica de 132 KDa y está formada por iones de cobre y zinc en su estructura. En el cerebro, la cantidad de esta enzima es mucho menor que las dos isoformas anteriores (Stralin, 1995).

4.2.2 Glutación

El glutación, descubierto en un extracto de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en 1888 por Rey-Pailhade, es un antioxidante no enzimático hidrosoluble, presente en numerosos tejidos (Sies, 1986), que juega un papel muy importante en el balance redox de la célula al constituir una fuente principal de poder reductor de la misma.

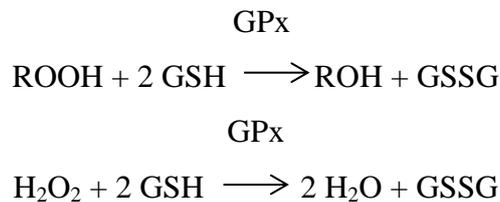
Estructuralmente el glutación es un tripéptido formado por los aminoácidos: ácido glutámico, cisteína y glicina (Nicolet, 1930), el cual se encuentra en el cerebro a concentraciones bajas (1-3 mM), y tiene una gran relevancia protegiendo frente al estrés oxidativo, actuando como un secuestrador de ROS (Koken et al., 1999). Existen dos formas, la reducida (GSH) y la oxidada (GSSG), en condiciones fisiológicas, predomina la forma reducida. El glutación es generado, a nivel cerebral, por la glutación reductasa (GR). Estudios indican la presencia de enzimas que metabolizan el glutación en cerebro (GR y GPx), aunque son menores que en otros tejidos, como el riñón e hígado (Martínez- Sámano et al., 2012).

El equilibrio entre las dos formas de glutación es fundamental, dado que el coeficiente de GSH/GSSG es un indicador del estrés oxidativo de un tejido. Cuando este coeficiente disminuye, es un indicador de que el tejido está sometido a un estrés

oxidativo que hace que El equilibrio entre las dos formas de glutatión es fundamental, dado que el coeficiente de GSH/GSSG es un indicador del estrés oxidativo de un tejido. Cuando este coeficiente disminuye, es un indicador de que el tejido está sometido a un estrés oxidativo que hace que predomine la forma oxidada del glutatión. Por lo tanto, es esencial para la célula mantener elevado el coeficiente GSH/GSSG para contrarrestar los efectos dañinos de los ROS y fomentar la citoprotección.

4.2.3 Glutatión peroxidasa (GPx)

La glutatión peroxidasa se descubrió por primera vez en eritrocitos en el siglo XX (Mills, 1957). Mayoritariamente se localiza en el citosol aunque algunas isoformas se localizan en la mitocondria y en las membranas celulares. Cataliza la reacción de reducción de hidroperóxidos inespecíficos procedentes de fuentes diversas (orgánicas, lípidos de membrana y restos nucleicos) a través de la oxidación del glutatión (Knappen et al., 1999). También es el sistema que se encarga de la detoxificación del peróxido de hidrógeno a concentraciones intracelulares bajas.



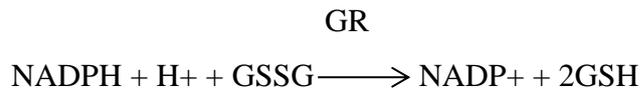
El sistema peroxidasa requiere para su funcionamiento la presencia de dos moléculas de glutatión en forma reducida (GSH), que actúan como cofactor específico de dicha enzima, cediendo hidrógeno y cuyo producto, la forma oxidada, sería objeto de la acción de un nuevo enzima, la glutatión reductasa (GR), que permitirá la regeneración de la forma reducida gracias a la oxidación simultánea de NADPH (Fig. 4). Encontramos dos isoformas; GPx dependiente e independiente de selenio. En este estudio hemos cuantificado la actividad de la enzima glutatión peroxidasa dependiente de selenio.

La enzima GPx dependiente de selenio es una enzima tetramérica que contiene 4 átomos de selenio en su centro activo unidos covalentemente en forma de selenocisteína. Se localiza en el citosol y en la mitocondria. En cambio, la enzima GPx independiente de selenio es dimérica y presenta un lugar de unión para GSH y otro para los sustratos electrofílicos, la cual encontramos en el citosol, mitocondria y en las

membranas celulares. Esta enzima juega un papel protector en el cerebro en respuesta a un aumento de los niveles de H_2O_2 (Marklund et al., 1982). Estudios experimentales han demostrado que si existen alteraciones en dicha enzima, el cerebro es más sensible al daño oxidativo (Hann et al., 1997).

4.2.4 Glutatión reductasa (GR)

La enzima glutatión reductasa es homodimérica (120 kDa) y está constituida por dos subunidades que se unen por medio de un puente disulfuro. Contiene un sitio de unión al NADPH y un sitio catalítico formado por flavín adenín dinucleótido (FAD) y un grupo disulfuro (Schulz et al., 1978). Tiene una localización citoplasmática y mitocondrial. Su función es catalizar la conversión de glutatión oxidado (GSSG) en glutatión reducido (GSH), utilizando NADPH como cofactor (Mannervik, 1999). Esta reacción consta de dos pasos: el primero implica la reducción del sitio catalítico por NADPH, y el segundo, en la que el grupo ditiol resultante reacciona con GSSG generándose dos moléculas de GSH.



La importancia del estudio se centra en analizar las defensas de antioxidantes en tejido cerebral, ya que son de vital importancia para disminuir los daños celulares producidos por la hipoxia/reoxigenación, además de analizar el daño oxidativo que provocan los ROS sobre biomoléculas como proteínas o lípidos, los cuales alteran las funciones que desempeñan dentro de la célula poniendo en riesgo la homeostasis celular y pudiendo, con ello, provocar la muerte (Figura 4).

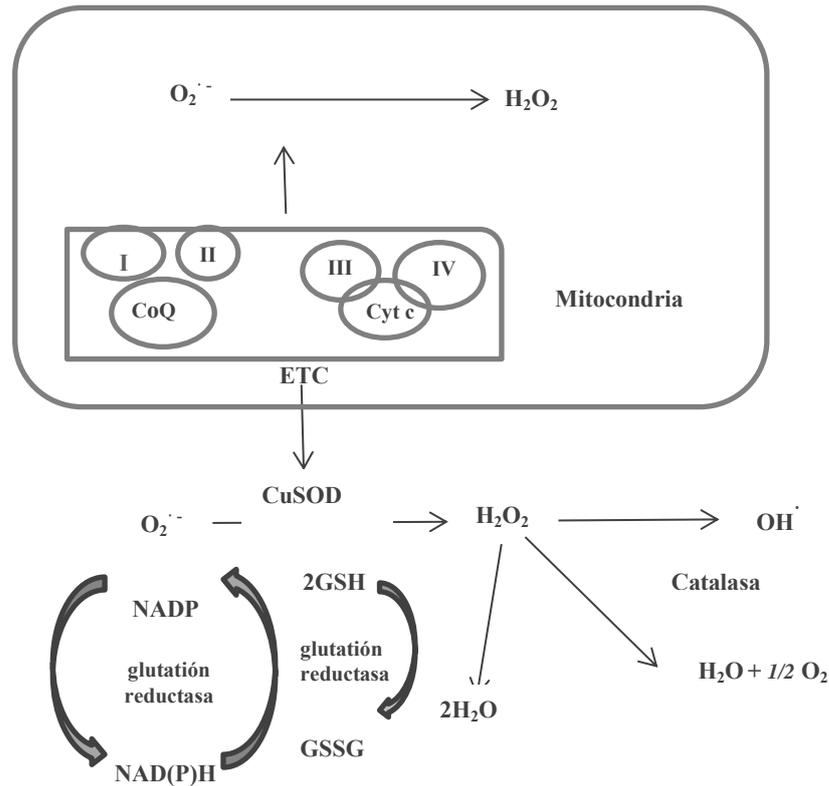


Figura 4: Eliminación de Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y peróxido de hidrógeno. Enzimas antioxidantes están presentes en la mitocondria y en el citosol.

La peroxidación lipídica está entre las lesiones más importantes que producen los ROS (radical superóxido, radicales halogenados o el radical perhidroxilo) destacando por el daño que generan al interactuar con los lípidos de membrana. El radical OH^{\cdot} y el H_2O_2 , aunque carecen de la reactividad necesaria para atacar los lípidos, en presencia de metales de transición podrían generar daño en las membranas, a través de la formación de radicales hidroxilo (Figura 5).

Este proceso puede alterar las membranas biológicas provocando un aumento de la viscosidad de las mismas, así como un descenso de su resistencia eléctrica. La composición de los ácidos grasos de las membranas celulares juega un papel muy importante durante este proceso. Así, un menor grado de instauración de los ácidos grasos podría ser ventajoso y provocar una disminución de la sensibilidad a la peroxidación lipídica (Pamplona and Barja, 2007). Los productos generados por la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados y de los fosfolípidos de la membrana (como por ejemplo malonaldehído o el 4-hidroxinonenal) son por sí mismos agentes

oxidantes que generan una reacción en cadena ampliando el efecto lesivo a toda la membrana, comprometiendo la correcta función celular.

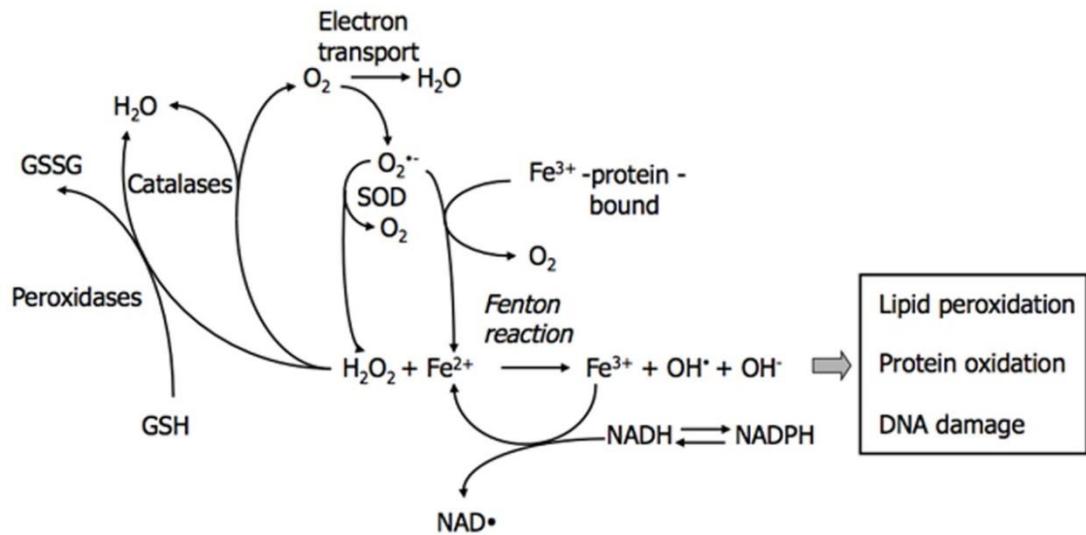


Fig. 5. Esquema de mecanismos antioxidantes y oxidantes (Carbonell y Rama 2009).

5. Disfunción mitocondrial y apoptosis

En el cerebro, la hipoxia induce alteración de la función mitocondrial. Por debajo de la “tensión crítica de oxígeno, la mitocondria *a*) aumenta la producción de ROS que lleva a una situación de estrés oxidativo (Ott y col., 2007); *b*) disminuye la biosíntesis de ATP causando una despolarización generalizada que lleva a la liberación excesiva de glutamato (excitotoxicidad) y vía NMDAR a una acumulación excesiva de Ca^{2+} intracelular en el citosol. El estrés oxidativo está inseparablemente unido a la disfunción mitocondrial, ya que las mitocondrias son tanto generadores y objetivo de ROS (Murphy, 2009). *Durante la exposición a la hipoxia, el aumento de los niveles de ROS alteran el potencial de membrana mitocondrial en las neuronas (Adams y Cory, 2000)* Los radicales libres inducen apoptosis vía mitocondrial (intrínseca), mediante un proceso que es modulado por la señalización MAPK a través de la activación de c-Jun N-terminal quinasa (JNK) implicada en el equilibrio entre la expresión de proteína antiapoptótica (Bcl-2, BclX) y apoptóticas (Bak, Bax, Bad) que actúa como un controlador de la liberación mitocondrial del citocromo c, una proteína residente del espacio intermembrana mitocondrial, necesaria para la activación de las proteasas apoptóticas efectoras conocidas como caspasas (Vander y Thompson, 1999).

Tanto el estrés oxidativo como la excesiva acumulación de Ca^{2+} intracelular citosólico, desencadenan a partir de la mitocondria una cascada de efectos que llevan a

la muerte celular por necrosis o por apoptosis (Nicotera y col., 1999; Langley y Ratan, 2004). Los ROS y la acumulación excesiva y prolongada de Ca^{2+} por la mitocondria, causan la alteración de la función de la mitocondria (Shinder y col., 1996; Duchon, 2000; Nicholls, 2009) y es considerado como un evento primario en la muerte de la neurona por excitotoxicidad (Shinder y col., 1996; Ott y col., 2007). Ambos mecanismos participan en la inducción de la cascada apoptótica (Wyllie 2010).

La apoptosis puede inducirse por una multiplicidad de efectores (Dewson y Kluck, 2009). Aquí nos referiremos a la apoptosis inducida por la hipoxia en las neuronas y en concreto a la apoptosis por vía intrínseca. (Radi y col 2014).

Las invaginaciones de la membrana dan lugar a formaciones en las que quedan recluidos restos del citoplasma y de las distintas organelas celulares. Cuando las enzimas que normalmente translocan la fosfatidilserina hacia la parte interna de la membrana dejan de funcionar, exponiendo, así, a este fosfolípido en la parte externa, la célula se convierte en fragmentos llamados cuerpos apoptóticos, cada uno de cuales se encuentra envuelto en la propia membrana citoplasmática. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por las células del sistema inmunológico que los rodean y que los reconocen como extraños debido a la exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática (Hail et al., 2006). De esta manera, se evita cualquier tipo de respuesta inflamatoria por parte del organismo. (Figura 6).

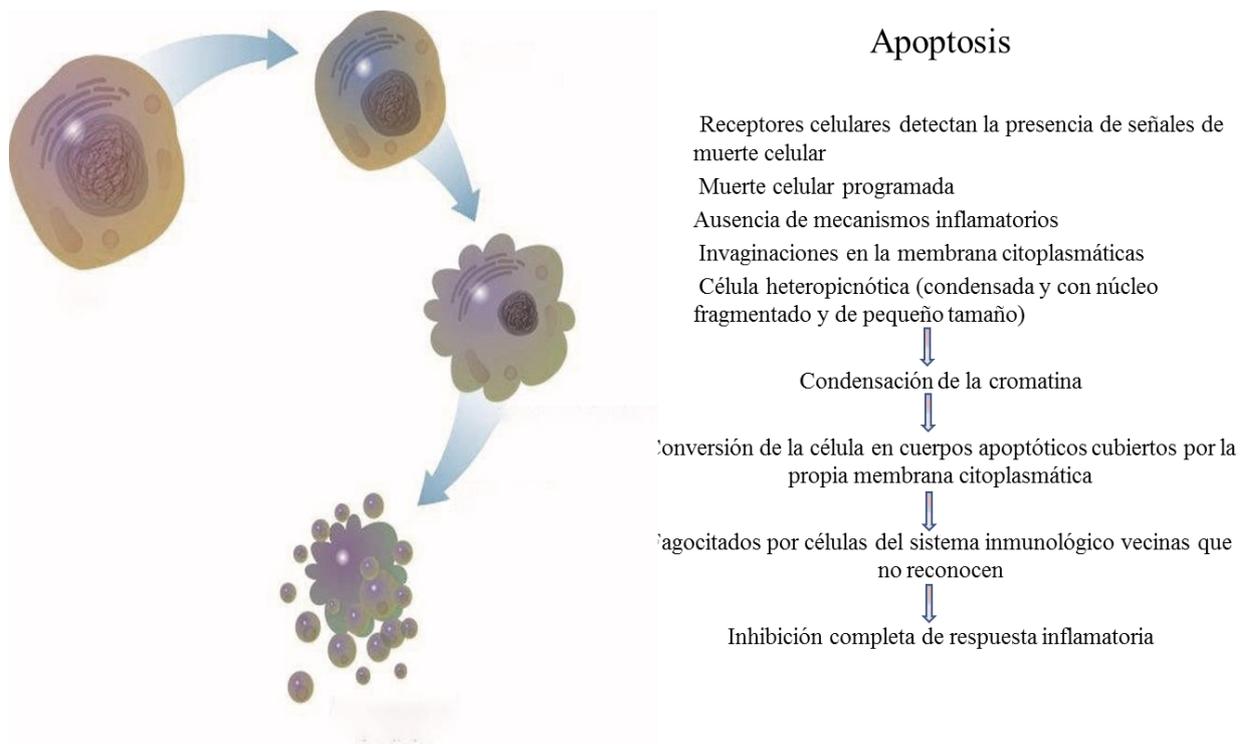


Figura 6: Activación de la cascada apoptótica.

La presencia de niveles altos de ROS y de Ca^{2+} causa alteración en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) y la apertura de poros de permeabilidad de la membrana (PPM). La importancia del mantenimiento del $\Delta\Psi$ y la regulación de PPM para la supervivencia celular es confirmado por el hecho de que el bloqueo de los PPM por ciclosporina causa la recuperación de $\Delta\Psi$ y aumenta la supervivencia celular (Ott y col., 2007). Los ROS y el exceso Ca^{++} intracelular están entre los factores que abren los PPM (Crompton y col., 1999). El poro de transición de permeabilidad (PTP) representa un complejo de proteína multimérica compuesta por el canal de aniones dependiente de voltaje (CADV) situado en la membrana mitocondrial externa (MME).

La vía apoptótica intrínseca se inicia en respuesta a una variedad de señales de estrés (Willis y Adams, 2005) y una compleja interacción de proteínas Bcl-2 transmiten estas señales a la membrana externa mitocondrial (OM) para iniciar la activación Bak y Bax y el daño de la OM. Violación de la mitocondrial OM libera factores apoptógenos, incluyendo citocromo c y DIABLO (también conocido como Smac), que activan un grupo de proteasas específicas por aspartato conocidas como caspasas (Youle y Strasser, 2008). Las caspasas, a su vez, unirá varios cientos de proteínas celulares para coordinar la destrucción de la célula (Dix et al, 2008).

La causa originaria de un evento apoptótico puede provenir de múltiples factores, como por ejemplo hipoxia, cambios en el pH celular y modificación del citoesqueleto. Estas condiciones elevan los niveles de calcio y óxido nítrico intracelular lo cual puede desencadenar modificaciones directas en el retículo endoplasmático afectando principalmente a la mitocondria, citoplasma y/o núcleo. Para tal efecto existen dos tipos de vías apoptóticas a las cuales se puede llegar, la extrínseca e intrínseca la primera se desencadena a partir de la activación de receptores de muerte en la membrana celular y la intrínseca se da a nivel mitocondrial. Dentro de la vía intrínseca independientemente de la razón de origen apoptótico, la membrana mitocondrial aumenta su permeabilidad y libera al espacio citoplasmático citocromo C y AIF (Factor inducible de apoptosis).

Es aquí en donde se genera el primer cambio funcional proteico ya que el citocromo C al salir al espacio celular modifica su función en la hidrólisis de ATP y se une al terminal WDA40 de la proteína Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor-1) y a su vez recluta procaspasas 9. Estos tres elementos forman un complejo llamado *apoptosoma* (el cual requiere ATP para su conformación) y es el inicio que marca la sincronización apoptótica resultando en una activación de diferentes tipos de caspasas y

en un efecto indirecto por parte de AIF en la degradación cromosómica (activando endonucleasa G y fragmentación del ADN). Por su parte la procaspasa 9, activa la caspasa iniciadora 9 la cual a su vez actúa sobre Caspasas 3, 6 y/o 7 siendo estas últimas efectoras sobre sus respectivos blancos proteicos y en ADN (generando también fragmentación) (Bellance et al. 2009; Becerra & Pimienta 2009).

BAX y BAK son miembros de la familia BCL-2 que son efectores de la apoptosis, sin ellos las células son resistentes a la mayoría de estímulos apoptóticos (Lindsten y col., 2000; Wei y col., 2001). BAX y BAK se localizan en la membrana mitocondrial externa (MOM), donde interactúan con CADV2 involucrando sus dominios transmembrana (TM). Mitocondrial BAX y BAK están constantemente retrotranslocados al citosol a ritmos diferentes, potencialmente a través de la interacción con las pro-supervivencia proteínas Bcl-2. (Dewson y Kluck, 2009). Las proteínas de la familia de Bcl-2 se agrupan en tres familias: la familia de las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 y otras); la familia de proteínas proapoptóticas de tipo "multidominio" (Bax y Bak) y las proteínas proapoptóticas de tipo "BH3-only" (Bid, Bim, Bad y otras). BAX está constitutivamente presente en la MOM, pero es activamente desplazado al citosol, un proceso denominado 'retrotranslocación'. En respuesta al estrés apoptótico, el mecanismo de desplazamiento se cierra, permitiendo a BAX adoptar su localización por defecto y acumularse en la MOM, una característica de la mayoría de las células apoptóticas (Edlich y col., 2011; Schellenberg y col., 2013). Más recientemente, BAK también ha sido propuesta para ser objeto de desplazamiento similar (Todt y col., 2015), aunque a un ritmo mucho más lento que BAX, de ahí su distinta localización subcelular en las células sanas. BAK se ha demostrado que interactúa con el canal aniones 2 dependiente de voltaje (CADV2) en la membrana externa mitocondrial, aunque si esta interacción influye positiva o negativamente en la función apoptótica de BAK no está claro (Cheng y col., 2003; Lazarau y col., 2010). Proteínas Bcl-2 pro-supervivencia inhiben la muerte celular por secuestrar el componente BH3 con lo que impiden la activación de BAX y BAK directamente. Si BAX y BAK se activan, pueden ser secuestradas por la proteína pro-supervivencia Bcl-2 desocupados. Una compleja red de interacciones competitivas y reversibles determina si BAX y BAK se activan para exponer su dominio BH3 (Aluvila y col., 2014)

La liberación del citocromo c se inicia por la disociación de la hemoproteína de su unión a la cardiolipina, que el ancla a la membrana mitocondrial interna. La oxidación de cardiolipina reduce citocromo c y lleva a un mayor nivel de "libre"

citocromo c en el espacio intermembrana. A la inversa, las enzimas antioxidantes mitocondriales protegen de la apoptosis. (Ott y col., 2007). Una vez liberado, el citocromo c puede activar la cascada de las caspasas, donde la caspasa-3, es el principal efector que conduce a la muerte neuronal por apoptosis. Después de ser liberado en el citosol, se une al factor-1 activador de la apoptosis (Apaf-1) en presencia de ATP, promoviendo la oligomerización de sí mismo; este complejo recluta la procaspasa-9, que forma el apoptosoma (Li y col., 1997). El ensamblaje del apoptosoma permite la auto-activación de la procaspasa-9, que es seguida por el reclutamiento y activación de procaspasa-3. La caspasa-3 escinde el inhibidor de desoxirribonucleasa caspasa-activado y activa una DNAsa, que conduce a la fragmentación del ADN (Li y col., 1997).

6. Hipoxia y factores de transcripción

Cuando se entra en déficit energético (ATP) se inicia una producción anormal de radicales libres iniciada por la insuficiencia de oxígeno y la desestabilización electrónica de los metabolitos. Estos son altamente reactivos, y conllevan rápidamente a cambios estructurales y funcionales (peroxidación de membranas, carboxilación de proteínas, desnaturalización de carbohidratos, daño del ADN, cambios enzimáticos, apoptosis y necrosis (Gil y col., 2008).

Las células no sólo producen factores nocivos para promover la muerte celular y la inflamación durante la hipoxia, sino que también forman factores de protección para poder sobrevivir a los episodios de hipoxia. Aquí el factor de transcripción inducible por hipoxia-1, (HIF-1), juega un papel importante. Curiosamente, el sistema de HIF-1 no sólo puede activarse en condiciones de hipoxia, sino también en condiciones inflamatorias. (Loor, 2008).

Los organismos dependiendo de la severidad y de la duración la hipoxia, reaccionan de manera diferente. Ya hemos señalado que el HIF aparece como el regulador principal de la respuesta a la hipoxia. HIF es un factor de transcripción que regula la expresión de genes que promueven la angiogénesis, la vasodilatación, la glucólisis y la eritropoyesis (Schofield y Ratcliffe, 2005). La inducción de tales genes conduce a un aumento de la perfusión tisular y el metabolismo anaeróbico, manteniendo así los niveles de ATP y la formación de una vía de adaptación fundamental para hacer frente a la amenaza hipóxica. Además, la hipoxia también activa NF- κ B, un factor de

transcripción crítico en la promoción y progresión de los procesos inflamatorios y anti-apoptóticas (Cummins y Taylor, 2005).

El factor nuclear kappaB (NF-kB) factores de transcripción (p50 / p105, p52 / p100, de RelA, c-Rel, RelB) y las vías que controlan la activación de NF-kB es mejor conocido por su papel en la respuesta inmune e inflamatoria (Hayden et al., 2006), pero también es crítico para muchos procesos fisiológicos y patológicos. Sin embargo, el mecanismo por el que la hipoxia activa NF-kB y su función en respuesta a la hipoxia siendo poco conocida. NF-kappa B es un factor nuclear que regula expresión procesos celulares relacionados con crecimiento y desarrollo, plasticidad neural, apoptosis, memoria y respuestas inflamatorias; de igual manera se encuentra expresado de manera anormal en patologías propias procesos inflamatorios y neurodegeneración (Bonavia y col., 2012).

La hipoxia activa NF-kB dependiente de la transcripción de genes y aumenta la sensibilidad de esta vía a la activación por estímulos proinflamatorios, tales como citoquinas (Cummins y Taylor, 2005). La hipoxia modula la señalización de NF-kB a través de la disminución de la hidroxilación de los reguladores clave de esta vía, es decir, los IKK. En estudios recientes (Cummins y col., 2005), IKKB es hidroxilado por PHD1 y PHD2 en normoxia, un evento que se traduce en suprimir la actividad enzimática IKKB que conduce a la modulación negativa de la señalización por NF-kB. La inversión de esta hidroxilación en la hipoxia se traduciría en un aumento basal. Cockman y col. (2006) han demostrado un papel para HIF en la hidroxilación de los miembros de la ruta de NF-kB.

7. Neuroprotección frente al daño oxidativo

Los organismos cuando detectan un déficit de oxígeno, dependiendo de la intensidad y de la duración, generan distintas respuestas. En conjunto se pueden distinguir dos modelos. Respuestas inmediatas en base a elementos presentes en la célula en condiciones fisiológicas y respuestas más tardías que requieren la síntesis de “protectores” que normalmente exigen la activación de genes. Ya hemos comentado la presencia de sistemas antioxidantes que protegen inicialmente ante el estrés oxidativo producido por la hipoxia. Ahora nos centraremos en mecanismos que tienden a aumentar el aporte de oxígeno o reducir su consumo.

7.1 Eritropoyesis y Angiogénesis

Como mecanismos que aumentan el aporte de oxígeno en respuesta a la hipoxia destacan el aumento de la eritropoyesis y de la angiogénesis:

a) Eritropoyesis: En 1975, Paul Bert correlacionaba la reducción de la presión barométrica con el aumento del número de eritrocitos. Pocos años después Viault afirmaba que la reducción del contenido de oxígeno en la sangre estimula la eritropoyesis (Viault 1890) y aunque la producción de eritrocitos era modulada por la eritropoyetina (Bonsdorff y Jalavisto, 1948) no se consiguió aislar la EPO hasta 1977 (Miyake y col., 1977). Más tarde, la proteína EPO humana fue purificada, lo que allanó el camino para la clonación del gen de la EPO y el desarrollo de la EPO recombinante para uso clínico (Jacobs y col., 1985; Lin y col., 1985).

En respuesta a la hipoxia a través de HIF-1, las células intersticiales peritubulares del riñón productoras de eritropoyetina liberan la EPO, que llega a la médula ósea y se activa la eritropoyesis. En el sistema hematopoyético, EPO promueve un aumento en la masa de glóbulos rojos y la capacidad de la sangre para transportar oxígeno.

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína con 165 aminoácidos y un peso molecular de 30,4 kDa, casi el 40% lo aportan los carbohidratos. La molécula de EPO tiene cuatro sitios de glicosilación, incluyendo tres N-ligado y uno O-ligado vinculados a cadenas laterales de oligosacáridos ácidos (Sasaki y col., 1988). Los glicanos N- son esenciales para la actividad biológica *in vivo* de la EPO (Dordal y col., 1985), principalmente por los residuos de ácido siálico terminales, que gobiernan la vida media biológica en la sangre. La asialo-EPO es eliminada rápidamente por los hepatocitos a través de receptores de galactosa (Spivak y Hogans, 1989) y protege la estructura de la proteína EPO de ROS (Uchida y col., 1997). La introducción adicional de N-glicanos en la EPO recombinante prolonga la supervivencia de las moléculas *in vivo* (Elliot y col., 2003)

El gen de la EPO era identificado como el mediador de la respuesta fisiológica a la hipoxia. Actualmente es uno de los genes mejor caracterizado activado por la hipoxia (Fandrey, 2004). El gen EPO humano está situado en el brazo largo del cromosoma 7, y consiste en cinco exones y codifica una prohormona de 193-amino-ácido y cuatro intrones (Jacobs y col., 1985). El gen EPO contiene el dominio favorecedor de respuesta a la hipoxia (HRE, hipoxia responsive enhancer) en la región 3' al que se pueden unir heterodímeros específicos de factores de transcripción inducidos por hipoxia (HIF- $\alpha\beta$).

La unión lleva a la activación del promotor EPO (Semenza y col., 1991). Aunque EPO es reconocido como un modulador importante de la eritropoyesis, una baja concentración de células rojas de la sangre por sí solo no estimula directamente la producción de EPO, pero requiere la presencia de una tensión de oxígeno disminuida. La regulación de la producción y secreción de EPO está basada en la presencia de una tensión de oxígeno baja y en la producción de ROS (Jelkmann, 1992) a través de un proceso regulado por HIF (Ebert y Bunn, 1999). Una vez que se recibe un estímulo hipóxico, EPO se libera posteriormente en la circulación de la sangre periférica, y a la llegada en la médula ósea, la EPO se une a su receptor que está altamente expresado en la superficie de las células progenitoras eritroides y conduce a la eritropoyesis (Broudy et al., 1991). Una vez clonado el gen de la EPO, (Jacobs et al, 1985; Lin et al, 1985), se inició el trabajo para identificar un receptor para EPO. EPO media sus efectos a través de la unión a una proteína de membrana celular, el receptor de EPO (EPOR). Desde la primera evidencia mostrando que la presencia de un receptor de membrana (EPORs) en tejidos eritroides (Chang y col., 1974; D'Andrea y Zon, 1990), el EPOR ha sido encontrado en muchas células no eritroides, incluidas astrocitos y neuronas (Digicaylioglu y col., 1995; Chin y col., 2000). Sin embargo, la estructura del EPOR de la superficie celular que media en los efectos biológicos de la EPO en los tejidos no-hematopoyéticos difiere del EPOR descrito en células eritroides. Por lo tanto, mientras que el receptor eritroide eritropoyetina (EPOR) consiste en un homodímero EPOR preformado (Livnah y col., 1999), con una conformación que, en ausencia de eritropoyetina, no permite la interacción de los dominios intracelulares uno con el otro, el receptor de protección eritropoyetina consiste en una heterodímero formado por dos subunidades EPOR homodímero y un receptor común β homodímero (β CR) (Brines y col., 2004). La subunidad del receptor de la EPO y el β CR pertenecen a una subfamilia de la superfamilia del receptor de citoquinas de tipo I. Los efectos de protección de tejido por la EPO parecen requerir la expresión de β CR y un receptor heterodimeric EPOR-CR (Brines y col., 2004).

La eritropoyetina promueve la supervivencia celular por la transducción de la señal celular iniciada por EPO y comienza con la activación de su receptor de membrana. Algunas de las vías de señalización que son utilizados por la eritropoyetina para la protección de los tejidos son similares a los de la eritropoyesis. Se ha sugerido que la unión de eritropoyetina a la EPOR induce un cambio conformacional que une los dominios intracelulares lo que resulta en la activación de la cascada de señalización que

implica la fosforilación y activación de la proteína 2 (JAK2) Janus quinasa tirosina (Wojchowski y col., 1999). La activación JAK2 media la fosforilación de la tirosina de los sitios situados en la porción citoplasmática de EPOR, lo que conduce al reclutamiento y la activación de vías de señalización secundarias que implican la activación mediada por mitógenos de proteína quinasa (MAPK), fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K), factor nuclear NF- κ B y activador de la transcripción 5 (STAT5) (Wojchowski y col., 1999; Digicayliogluy y Lipton, 2001).

Estudios *in vitro* sobre la expresión de la EPO y el sistema del receptor de la EPO en neuronas y astrocitos indicaban que la EPO podía funcionar como un factor autocrino-paracrino en el cerebro (Sakanaka y col., 1998; Ruscher y col., 2002). Esto sugiere que la EPO podría actuar sobre el SNC como un neurotrófico y un factor neuroprotector. En las dos última década, la expresión ubicua del sistema EPO/EPOR en células no eritroides ha abierto la puerta al descubrimiento de otras funciones biológicas de EPO en tejidos no hematopoyéticos. En la actualidad existe amplia evidencia de que la EPO protege las neuronas de la muerte celular causada por hipoxia severa, trauma, toxinas, mecánica, química o isquemia. EPO puede ejercer su función protectora activando a muchos componentes comunes a muchas vías neurodegenerativas, lo que resulta en una plétora de acciones (Brines y col., 2005). Mecánica, EPO actúa de manera coordinada en múltiples niveles, incluyendo la reducción de los niveles de ROS e inhibiendo la apoptosis. Las funciones biológicas de EPO en el cerebro se han recogido en varios excelentes revisiones (Brines y Cerami, 2005; Arcasoy, 2008; Rabie y Marti, 2008).

Esta neuroprotección mediada por EPO parece involucrar diversos mecanismos tales como retraso o detención de la apoptosis, la modulación de la excitotoxicidad, acción antioxidantes, y la prevención de la inflamación (Bernaudin y col., 1999; Genc y col., 2004; Liu y col., 2005; Maiese y col., 2004). En hipoxia, la expresión de EPO y del EPOR es controladas por HIF-1 tanto en el sistema vascular como en el sistema neuronal. HIF-1 es esencial para la producción y secreción de EPO en respuesta a la hipoxia (Ikeda, 2005). En células eritroides, la unión de la EPO a su receptor provoca su homodimerización y la posterior fosforilación de la Janus-tirosina-quinasa-2 (JAK-2) que es activada. Esto lleva a la participación de moléculas de señalización secundarias, tales como el transductor de señal y activador de la transcripción 5 (STAT5) seguido por la activación de la proteína quinasa activada por el mitógeno Ras (MPK); ERK-1-2 y PI-K/AKT (Rabie y Marti, 2008). Además EPO induce la expresión de la proteína anti-

apoptótica Bcl-2 vía activación de NF- κ B y de Akt, que inhibe la liberación de citocromo c por la mitocondria protegiendo a la célula de la apoptosis. . Muchas de estas vías parecen funcionar también en el cerebro (Brines y Cerami, 2005; Kilic y col., 2005). Actualmente hay suficientes datos que demuestran que la EPO en el SNC está implicada en procesos tales como neuroprotección, neurogénesis y angiogénesis (Noguchi y col., 2007; Rabie y Marti, 2008).

b). Angiogénesis. En la hipoxia, HIF-1, junto con la inducción de la expresión de EPO y posterior aumento en los valores de hematocrito, actúan sobre diversas genes diana que regulan la expresión de factores de crecimiento vasculares, entre los que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que promueve el crecimiento de la red capilar que aumenta la disponibilidad de oxígeno en el cerebro. (LaManna y col., 1992). La hipoxia evoca respuestas adaptativas principalmente a través de la producción de múltiples citosinas angiogénicas y factores de crecimiento entre los que destaca el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que estimula la angiogénesis, formación de nuevos capilares y la arteriogénesis, remodelación de vasos que ya existen, que llevan a un aumento del diámetro luminal y del flujo sanguíneo (Rey y Semenza, 2010) facilitando un aumento del aporte de oxígeno. La función angiogénica del VEGF también implica una acción antiapoptótica mediada por el VEGFR-2 que promueve la supervivencia de células endoteliales vía PI3-K/Akt (Bulnes y Lafuente, 2007).

7.2 Activación de los astrocitos

Los astrocitos, entre otras funciones tales como el control del ambiente iónico y metabólico del neuropilo, que define el denso entramado de terminaciones axónicas, dendritas y prolongaciones de células de la neuroglia, que se encuentra en la materia gris del cerebro y la médula espinal aparecen implicados en los mecanismos neuroprotectores frente al estrés oxidativo debido a que contienen concentraciones mayores de GSH y de enzimas involucradas en el metabolismo del glutatión que las neuronas. Además, los astrocitos son capaces de producir SOD y secretarla al espacio extracelular. Existen evidencias que apuntan que los efectos neuroprotectores de los astrocitos son mediados por la transferencia del GSH o sus precursores a las neuronas. Cuando las neuronas son cultivadas en presencia de astrocitos son más resistentes a las lesiones inducidas por ROS y RNS. La protección de las neuronas frente al estrés

oxidativo está reducida cuando los astrocitos tienen reducido el contenido de GSH (Costa, S. y col. 2002).

En hipoxia, la activación de los astrocitos es necesaria para mantener la función cerebral. Ante cualquier deterioro del tejido nervioso, ya sea en situaciones de lesión neuronal, enfermedad e incluso envejecimiento, la glía posee la capacidad de responder experimentando cambios morfológicos y funcionales de manera gradual y estereotípica, acompañados por la producción de citocinas proinflamatorias, lo que se denomina como “gliosis reactiva o glía activada”.

La respuesta inflamatoria del cerebro está producida por las células gliales, en especial la microglía. Se considera que el microambiente del SNC en estado normal inhibe tónicamente la activación glial y que ésta se origina en aquellas zonas donde se ha producido muerte o lesión neuronal o donde existe una disrupción en la comunicación entre las células gliales y las neuronas (Hong y col., 2003). La activación glial puede ser iniciada o modificada por moléculas que comúnmente son secretadas durante la neurotransmisión (fractalkina y ATP). Al activarse, las células gliales experimentan una serie de cambios morfológicos y de expresión de su perfil antigénico, son capaces de migrar a los sitios de la lesión, donde proliferan, expresan moléculas del MHC de clase II y moléculas coestimuladoras que les permiten actuar como células presentadoras de antígeno y además pueden adquirir un fenotipo fagocítico. Además, las células gliales activadas producen una gran variedad de factores neurotóxicos y proinflamatorios que incluyen a las citocinas, metabolitos de los ácidos grasos y radicales libres como el ión superóxido y el NO, que son capaces de amplificar la respuesta inflamatoria (Hanisch, 2002). La activación glial puede resultar beneficiosa, en el sentido de que puede promover la reparación de tejidos, la eliminación de restos celulares o la destrucción de patógenos. Sin embargo, una activación excesiva puede ser extremadamente nociva e inducir y/o exacerbar la neurodegeneración (Hanisch, 2002).

Cuando la activación es excesiva se puede observar una importante activación de los astrocitos que consiguen sobrevivir al daño, que prolifera y se hipertrofian. Esto da lugar a la formación de una barrera o cicatriz que aísla el área de la lesión. Este proceso se conoce con el nombre de astrogliosis reactiva o gliosis anisomòrfica. La cicatriz que se forma consiste esencialmente en la acumulación de astrocitos reactivos en el área de la lesión; es cierto que los astrocitos poseen un efecto neuroprotector, también se ha

demostrado que constituyen un obstáculo para el restablecimiento de nuevas conexiones. Las neuronas dañadas que pierden su inervación original son ahora inervadas por brotes axonales de neuronas próximas no dañadas y esto, en general, no conduce a la recuperación de la función original. Los astrocitos reactivos pueden ser un impedimento para el restablecimiento axonal ya que esa superficie suministra un medio no permisivo al crecimiento neurítico a través del incremento en la expresión de GFAP (Proteína fibrilar) y proteoglicanos. (Costa y col. 2002).

8. Proteínas anti-apoptóticas

El establecimiento de los procesos apoptóticos y cito-protectores es complejo por su simultaneidad, éstos se hallan se encuentran en vías de dilucidación. (Arango-Davila y col., 2004). La expresión en el cerebro de dos proteínas de choque térmico la HSP70 y la HSP27, es notable debido a que ambas proteínas son altamente inducibles en células gliales y las neuronas durante los procesos de estrés. La participación de las HSP en una multitud de acciones intracelulares las coloca como coordinadoras centrales para decidir el destino de la célula. (Sreedhar, 2004). A partir de estudios clínicos exitosos, está claro que las HSPs se pueden utilizar como nuevas dianas moleculares para intervenciones farmacológicas y la terapéutica tanto para prevenir como para causar la apoptosis (Sreedhar, 2004).

La exposición celular a un estrés leve como una hipoxia moderada, provoca un mecanismo auto-protector cerebral frente a un estrés severo posterior, siendo el grado de protección dependiente del nivel de síntesis de HSPs producida por el estímulo previo (fenómeno de pre-condicionamiento). Una corta exposición a la hipoxia cerebral podría servir de "condicionante" para un cerebro durante un período posterior de hipoxia severa, la cual entonces provoca menos daño. Estudios previos demuestran que la hipoxia hipobárica intermitente no induce estrés oxidativo cerebral y previene la expresión de algunos mediadores de apoptosis (Costa y col., 2013).

Se sabe que la HSP27 se expresa constitutivamente en el cerebro de los mamíferos, en particular en astrocitos y su sobreexpresión confiere resistencia al choque térmico (Plumier y col., 1997).

Las HSPs tienen capacidad para bloquear procesos neuro-degenerativos. Estudios recientes han demostrado que la sobreexpresión de HSP27 protege las células neuronales de la liberación de factores tróficos, inhibe la activación de procaspases 9 y 3, y lo más interesante, HSP27 fosforilada bloquea Fas inducida por apoptosis.

HSP27 puede bloquear los procesos de apoptosis en varios niveles, lo que podría explicar muchas de las actividades de protección de HSP27. Estudios *in vivo* han demostrado que aunque el mecanismo que subyace a la protección de las neuronas CA1 por pre-condicionamiento isquémico no se entiende completamente, se ha demostrado que se fundamentan en la inducción de proteínas de choque térmico (Currie, et al, 2000). La mayor parte de los efectos cito-protectores de HSP provienen de la inhibición de la apoptosis inducida por el estrés. La resistencia a la apoptosis está asociada con la alta expresión de HSP, que trabajan para mantener la homeostasis fisiológica de la célula, requisito importante para la supervivencia celular.

El pre-condicionamiento ha demostrado que la rápida inducción de las HSPs causados por factores de estrés leves confiere protección contra un evento posterior y más grave, lo que sugiere que la expresión inicial de las HSPs es importante para la supervivencia celular subsiguiente. Aunque no se ha identificado específicamente las HSP como responsables de los efectos protectores, puede ser que HSPs diferentes tengan funciones protectoras que son espacial y temporalmente específicas en el cerebro bajo una leve hipoxia (Franklin, et al. 2005). Se ha demostrado que la sobreexpresión de HSP70 sirve para proporcionar neuro-protección contra isquemia cerebral *in vitro* (Sreedhar, 2004), y que el nivel expresado de HSP27 aumenta después de tratamientos sub-letales de privación de oxígeno, lo que indica que es una respuesta al estrés metabólico. HSP27 fosforilada podría estar involucrada en la cito protección observada en el pre-condicionamiento (Valentim, et al. 2003).

9. Reoxigenación y Pre-condicionamiento

Reoxigenación

En patologías como el infarto y el ictus causadas por una disminución severa del flujo sanguíneo la reoxigenación del área isquémica es un objetivo terapéutico prioritario. Sin embargo, la reperfusión en sí causa daño adicional, sustancial denominado "lesión por reperfusión." Los mecanismos implicados en la lesión por reperfusión han sido asociados a un aumento repentino de la producción de ROS que desencadena estrés oxidativo en el área isquémica que puede causar un aumento de la lesión.

Reperfusión

En accidentes cardiovasculares isquémicos, como el infarto y el ictus, el daño isquémico tisular se atribuye generalmente a un período profundo y prolongado de hipoxia

tisular y al consecuente agotamiento de ATP celular. Durante mucho tiempo se ha aceptado que la supervivencia del tejido isquémico puede garantizarse mediante la restauración oportuna de flujo sanguíneo (reperfusión), lo que llevaría a minimizar la magnitud de la lesión hipóxica, a la reposición de los niveles celulares de ATP, a restablecer el equilibrio iónico dentro de la célula, y en última instancia a la restauración completa de la función del órgano. Sin embargo, la predecible influencia beneficiosa de la perfusión precoz en la recuperación del daño tisular después de la isquemia fue impugnada en la década de 1970 por publicaciones que describían un paradójico aumento de la lesión en respuesta a la reoxigenación del tejido isquémico (o hipóxico). Esto condujo a la propuesta (Hearse y col., 1973) de que la reintroducción repentina de oxígeno molecular en tejidos con déficit severo de energía (y oxígeno) llevaba a un único tipo de lesión que no se manifiesta durante el periodo de estrés hipóxico (Granger y Kviety, 2015). Los ROS son actualmente considerados como mediadores importantes de la lesión por perfusión. Con la perfusión de tejido isquémico, se crea un desequilibrio entre la tasa de generación de ROS y la capacidad del tejido para desintoxicar estas especies reactivas (Sanderson y col., 2013).

Como resultado de una mejora continuada de las tecnologías y la metodología experimental la investigación sobre la lesión por perfusión ha pasado desde los efectos directos de los ROS a centrarse sobre los aspectos moleculares de la disfunción celular resultante de la activación de los eventos de señalización dependientes de ROS que subyacen a la lesión por perfusión. A pesar de la extensa literatura que implica a ROS en esta respuesta a la lesión, el beneficio clínico de terapias dirigidas a contrarrestar los efectos de ROS han sido nulo o muy limitado (Camara y col., 2010).

Pre-condicionamiento

La hipoxia moderada provoca un mecanismo autoprotector cerebral. Injurias moderadas y breves en el cerebro puede conducir a una regulación metabólica y molecular autoprotectora llamada "precondicionamiento" (Chen y Simon, 1997). Una corta la isquemia cerebral puede servir de "condicionante" para un cerebro durante un período posterior de isquemia severa, la cual entonces provoca menos daño. Esta exposición hipóxica inicial aumenta notablemente la expresión de HIF-1 α y HIF-1 β (Bergeron et al., 2000). Este efecto de pre condicionamiento podría ser también logrado mediante la aplicación de dos químicos inductores de HIF-1, cloruro de cobalto (CoCl₂) o deferoxamina (DFX), que dieron como resultado la protección del cerebro en un 75 y 56%, respectivamente (Bergeron y col., 2000).

II.-Objetivos

II. Objetivos

General:

Determinar si la exposición a la hipoxia intermitente moderada de corta duración puede actuar como un tratamiento preventivo sobre el daño cerebral causado por una exposición a hipoxia aguda severa.

Específicos:

1. Caracterizar los efectos dañinos de una exposición a hipoxia aguda severa en el cerebro de ratas sobre las vías de estrés oxidativo y apoptóticas a diferentes tiempos de reoxigenación.

2. Evaluar si el modelo de hipoxia hipobárica intermitente (pre-condicionamiento) puede inducir cito-protección en el cerebro de ratas.

3. Caracterizar los posibles efectos neuroprotectores de la exposición a hipoxia hipobárica intermitente moderada de corta duración, previa a un daño oxidativo y neuronal causado por un protocolo de hipoxia aguda normobárica. Analizar la activación de proteínas antiapoptóticas y valorar el sistema antioxidante.

III.- Materiales y Métodos

3. Materiales y Métodos

3.1 Procedimiento de investigación

Todos los animales utilizados en el presente estudio fueron ratas macho adultas de la raza Sprague–Dawley de un peso aproximado de 240-280g, procedentes de Harlan Laboratorios. Fueron alimentadas con una dieta estándar a la cual accedían libremente así como al agua, y estabuladas en condiciones de luz/oscuridad en ciclos de 12h de duración. El protocolo experimental fue revisado y aprobado por el Comité Ético Institucional para el Cuidado e Investigación con Animales de la Universidad de Barcelona y en concordancia con la normativa del Consejo Directivo de la Comunidad Económica Europea del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC) publicado en “Principales cuidados de los animales de laboratorio” (Publicación NIH No. 85-23, revisada en 1985) así como las leyes nacionales españolas (Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio). Todos los procedimientos se han ajustado a la legislación europea vigente (2010/63/UE).

3.2 Diseño experimental

El presente estudio fue dividido en 2 bloques experimentales, antes de los cuales fue realizado un experimento preliminar para establecer ciertos parámetros para el subsiguiente estudio.

Experimento Preliminar

Un experimento preliminar se llevó a cabo para determinar el efecto de la exposición a la hipoxia sobre el nivel de oxígeno en los tejidos del cuerpo. Para ello, cinco ratas fueron anestesiadas bajo 4% de halotano y entonces se les insertó una cánula en la arteria femoral izquierda. Cuatro días después de ser anestesiadas las ratas fueron expuestas a hipoxia durante 6 h en una cámara con la $FiO_2 = 7\%$. La temperatura en la cámara normobárica se mantuvo a 22 ± 1 °C, con una tasa de flujo de aire de 2 L / h. Muestras de sangre fueron tomadas de la arteria femoral izquierda antes y después de la exposición a la hipoxia. En cada muestra de sangre se analizó el contenido de los ases respiratorios (PaO_2 y $PaCO_2$), la saturación arterial de oxígeno de la hemoglobina (SaO_2) y el pH arterial usando un sensor de Oxígeno (ABL 510, Radiometer, Copenhague, Dinamarca).

Diseño Experimental 1

Caracterización del daño oxidativo en cerebros de ratas sometidas a un impulso agudo de hipoxia severa en cámara normobárica.

Esta condición experimental se creó para caracterizar los efectos de la hipoxia normobárica en cerebros de ratas sometidas a una exposición de hipoxia severa en un tiempo moderado de 6 h continuas y observar si el protocolo aplicado es suficiente para provocar un daño oxidativo en el cerebro de las ratas.

Para este ensayo, 54 animales fueron divididos aleatoriamente en cuatro grupos (Figura.7): grupo control, las ratas fueron colocadas en la cámara durante 6 h sin exposición a la hipoxia; grupo de hipoxia (H), las ratas fueron expuestas a hipoxia (6 h en una mezcla gaseosa de 93% de N y 7% O₂); grupo re-oxigenación 1 (RO-1), las ratas fueron colocadas en la cámara y expuestas a la hipoxia (6 h en una atmósfera de 93% de N y 7% de O₂), seguido de 24 h en normoxia (24 h re-oxigenación) y; grupo de re-oxigenación 2 (RO-2), las ratas fueron expuestas a hipoxia (6 h en una atmósfera de 93% de N y 7% de O₂), seguido de 48 h en normoxia (48 h re-oxigenación). La FiO₂ fue controlada todo el tiempo con un sensor de oxígeno ISO₂ World Precision Instruments. Durante el experimento el 18,5% de los animales murieron durante el período de hipoxia. Los 44 animales restantes fueron anestesiados con isoflurano por inhalación durante 1 min y después se sacrificaron por decapitación.

Experimento 1

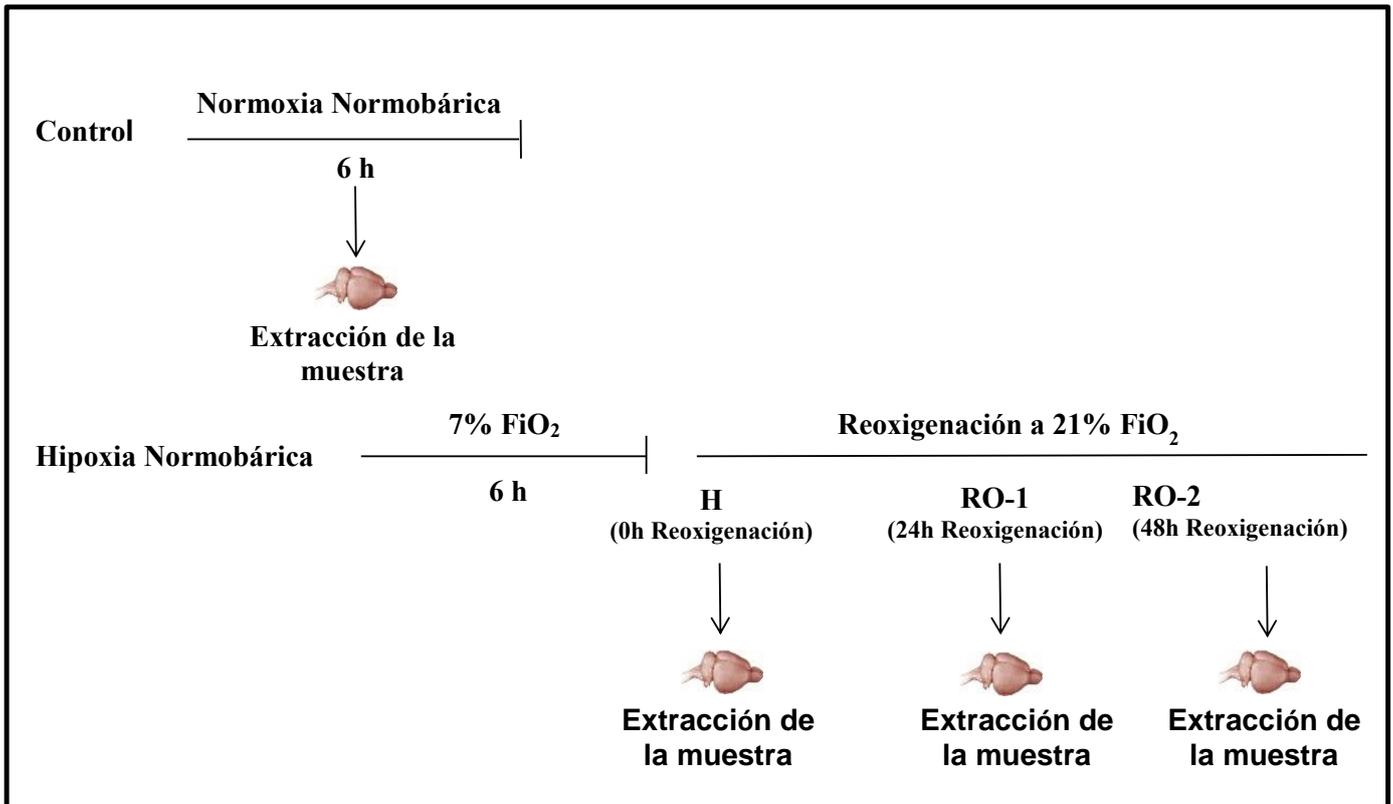


Figura 7: Experimento 1: Tratamiento con hipoxia 7% de FiO₂ en cámara normobárica durante 6h continuas y diferentes tiempos de reoxigenación.

Para realizar el tratamiento de hipoxia, las ratas fueron colocadas en una cámara plástica con una capacidad aproximada de 75 L, herméticamente sellada (Figura 8). En dicha cámara se ubicó un sensor que controlaba la cantidad de O₂ dentro de ésta y las condiciones de temperatura y humedad constantes. Para bajar el porcentaje de oxígeno de la cámara, inicialmente se introdujo nitrógeno puro con un flujo de aire de 1 L/min durante 15 min, con la válvula de escape de gases abierta, para permitir el lavado del aire normóxico existente en la cámara hasta alcanzar el porcentaje deseado de 7% de oxígeno interno. Una vez logrado el porcentaje deseado, la bombona de nitrógeno puro se cerró y se abrió la de mezcla de nitrógeno (93%) y oxígeno (7%) para mantener la FiO₂ al 7% constante dentro de la cámara.



Figura 8: Cámara normobárica fabricada para el diseño experimental propuesto para la tesis. Se puede observar la bombona de mezcla de gases y la de nitrógeno en la parte inferior, ambas conectadas a la cámara por cánulas. En la parte lateral de la cámara observamos el sensor de oxígeno, *ISO₂ de World Precision Instruments*. Dentro de la cámara hay un pequeño ventilador, válvulas laterales y pequeñas pastillas de cloruro cálcico anhidro (CaCl_2), para la absorción de la posible humedad generada dentro de la cámara.

Los grupos de hipoxia normobárica aguda fueron sometidos a una única sesión de hipoxia al 7% (mezcla de gases: 93% N_2 y 7% O_2) durante 6 h en dicha cámara. Los 15 primeros min de la sesión fueron de *bajada*, esto es, una disminución progresiva y constante del porcentaje de oxígeno hasta llegar al 7%, mientras que los últimos 15 min fueron de *subida*, es decir, realizando un aumento progresivo del porcentaje de oxígeno en la cámara hasta llegar al porcentaje atmosférico (21%).

Finalizada la sesión, en el caso del grupo H (0 horas de re-oxigenación), las ratas fueron inmediatamente anestesiadas y sacrificadas por decapitación. Los grupos RO-1 y RO-2 fueron devueltos a sus jaulas y sacrificados pasados los tiempos indicados.

Diseño Experimental 2

Evaluar si el modelo de hipoxia hipobárica intermitente puede actuar como neuroprotector cuando es aplicado antes de un impulso agudo de hipoxia normobárica.

Para el ensayo experimental 2, fueron utilizadas 44 ratas macho. Estas fueron divididas aleatoriamente y separados en cuatro grupos (Figura 9.): Grupo I: Control: constituido por ratas que permanecieron en normóxia durante un periodo de 8 sesiones diarias de 4 h dentro de una cámara hipobárica intermitente y luego en una cámara normobárica por 6 h, sin experimentar hipoxia en ninguna de esas sesiones. Grupo II: Hipoxia Severa (HS): ratas expuestas a hipoxia (7% FiO₂) en cámara normobárica (mezcla de nitrógeno (93%) y oxígeno (7%)) durante una sesión de 6 h continuas, y fueron decapitadas inmediatamente después de salir de la cámara normobárica, sin reoxigenación. Grupo III: Hipoxia Hipobárica Intermitente (HHI): ratas expuestas a hipoxia 4 h al día durante 8 sesiones en una cámara hipobárica con presión barométrica para reproducir una altitud de 4000 m.s.n.m. con una temperatura dentro de la cámara de 22±1°C y flujo constante de aire de 2 L/h. Grupo IV: Hipoxia Hipobárica Intermitente + Hipoxia Severa (HHI+HS): grupo de ratas aclimatadas previamente con ocho sesiones diarias de hipoxia hipobárica intermitente (como en el grupo HHI) y a continuación las ratas fueron expuestas a un insulto agudo de hipoxia idéntico al del grupo de hipoxia normobárica aguda del experimento 1 (6 h de hipoxia al 7% O₂) e inmediatamente sacrificadas.

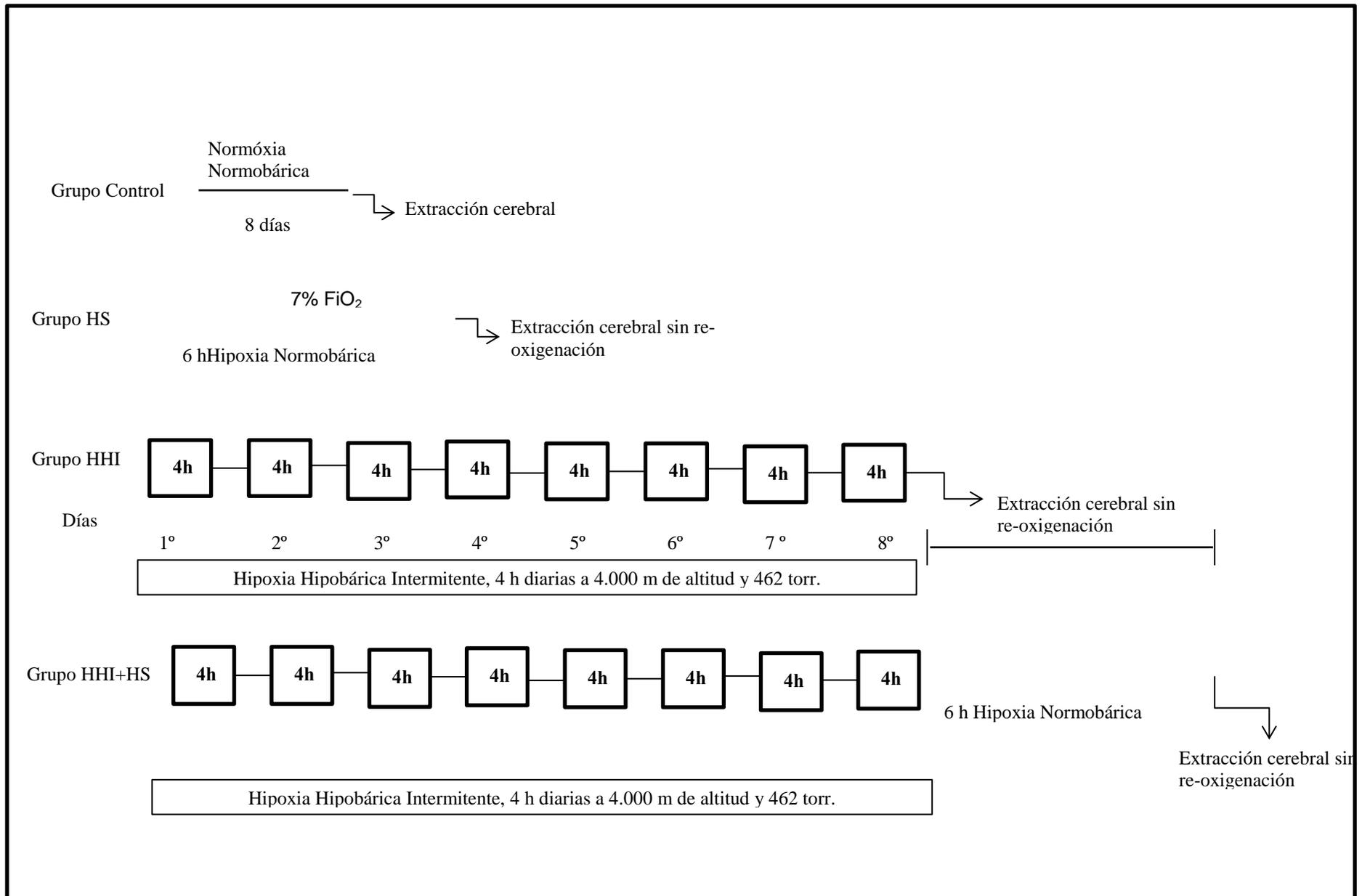


Figura9: Experimento 2: Tratamiento con hipoxia intermitente en camera hipobarica como preconditionamiento a exposición a hipoxia severa.

Para el tratamiento de hipoxia hipobárica intermitente, las ratas fueron colocadas en una cámara hipobárica con las siguientes características: Las paredes de la cámara están hechas de plástico acrílico de polimetil metacrilato transparentes, facilitando la observación de los animales. Se produce un gradiente de presión negativa mediante una bomba de vacío (TRIVAC D5E, Oerlikon Leybold Vacuum, Colonia, Alemania) regulando el flujo de aire que entra en el interior de la cámara (Figura 10.).

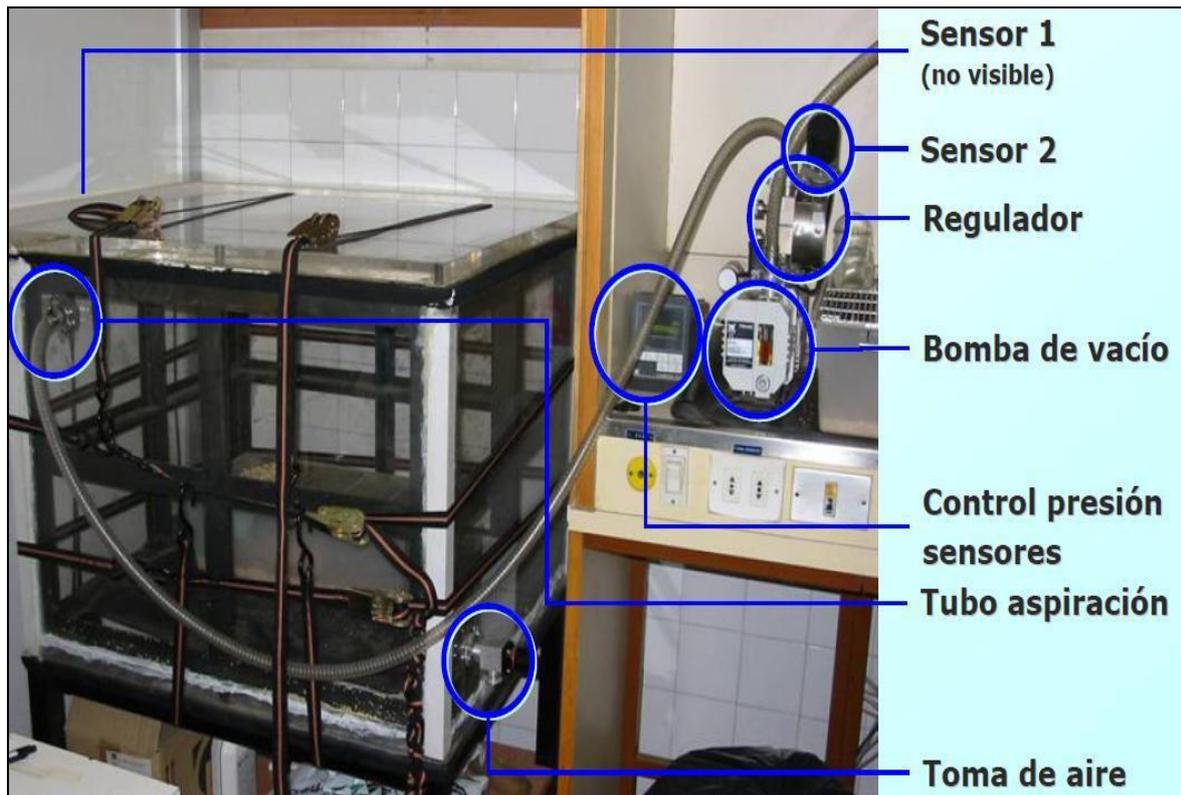


Figura 10: Cámara hipobárica del departamento de fisiología e inmunología de la facultad de biología de la universidad de barcelona.

3.3. Extracción del tejido cerebral

Una vez extraídos, los cerebros se pesaron y fueron divididos por hemisferios, se lavaron inmediatamente con solución salina isotónica helada (0.154 M KCl), se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta el momento de homogenizar. Los hemisferios fueron utilizados para diferentes pruebas, un lado se utilizó para los ensayos de estrés oxidativo y el otro para los análisis de Western blot. Previamente a dichos ensayos, los cerebros fueron pulverizados con un mortero y nitrógeno líquido para un correcto homogenizado posterior.

3.4 Preparación de los homogenados con tejido cerebral

En un principio se homogenizaron 80 mg de tejido cerebral congelado en un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido para evitar su degradación. A continuación, el polvillo resultante se transfirió a tubos eppendorfs partes iguales de la siguiente forma:

- 1 eppendorf para el análisis de las enzimas.
- 1 eppendorf para realizar el análisis de TBARs.
- 1 eppendorf para el análisis de NO.
- 1 eppendorf para cuantificar los niveles de GSH y GSSG.

Estos viales fueron almacenados a -80°C hasta el momento de su homogenización.

Homogenados para enzimas.

Para realizar los homogenados se diluyeron las muestras en tampón GR (50 mM de fosfato de sodio, 1 mM EDTA a pH 7.5) hasta ajustarlo al 20%.

Para homogenizar las muestras se utilizó el sonicador, durante este proceso las muestras se mantenían en hielo para evitar su degradación. A continuación se recogió el homogenado resultante y se centrifugó durante 10 min a 600 g a 4°C . Posteriormente se recogieron 2 alícuotas del sobrenadante para determinar la actividad de la SOD.

El sobrenadante resultante se volvió a centrifugar durante 10 min a 10.000 g y a 4°C . Del sobrenadante obtenido se alicuotaron 3 eppendorfs; con el primero de ellos se determinó la actividad de la glutatión reductasa (GR), con el siguiente se realizó el ensayo de proteínas oxidadas (AOPP) y el último se utilizó para determinar la actividad de GPx.

Homogenados para TBARs

Para realizar los homogenados se diluyó la muestra en tampón RIPA (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 5mM NaF, 0.1% de SDS, 1% de Tritón X-100, 1% desoxicolato de sodio) a pH 7.4 con inhibidor de proteasas (Leupeptina 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pepstatina, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PMSF 1 mM, 1 mM Navon, aprotinina, 1.7 mg/mL) hasta ajustarla al 20% (p/v).*

Para homogenizar las muestras se pasaron por el sonicador, durante este proceso las muestras estuvieron en hielo para evitar su degradación, a continuación se dejaron incubar en hielo durante 30 min. Una vez finalizó este período se extrajo una alícuota para cuantificar las proteínas que contenían las muestras para que posteriormente se pudiese llevar a cabo una dilución con tampón RIPA para llegar a la concentración de

15 mg proteína/mL. Una vez llegada a la concentración deseada se extrajeron 4 alícuotas de 50 μ L/ependorff y se almacenaron a -80°C hasta que se inició el protocolo de TBARs.

*NOTA: Por cada 5 mL de RIPA se añadió 50 μ L de mezcla de inhibidores de proteasas y 50 μ L de PMSF 0.1 M.

Homogenados para NO

Los cerebros fueron descongelados por grupos en una cámara fría a 4°C . Cada cerebro con sus respectivos hemisferios (1 g) tratados por separado se homogenizaron con tampón de lisis (Tris- HCl 10 mM, 320 mM de sacarosa, 10 mM de EDTA, a un pH de 7,5) y 1 tableta/50 mL del cóctel de inhibidores de proteasas (SC-29130) de Santa Cruz Biotechnology Inc. de California. El volumen fue homogenizado manualmente en tampón RIPA Buffer 1/5, a través de un homogenizador de vidrio “Dounce” impactándolo 20 veces.

Las muestras fueron mezcladas (agitadas) durante 10 min, centrifugadas a 10.000 g durante 20 min a 4°C y divididas en alícuotas de 500 μ l del homogenado en tubos eppendorff. Estas muestras fueron almacenadas a -80°C , hasta su análisis.

Homogenados para GSH y GSSG.

Para realizar los homogenados se diluyeron las muestras en tampón fosfato de potasio 0.1 M con 5 mM EDTA a pH 6.76 hasta ajustarlo al 20% (p/v).

Las muestras se homogenaron en el politron, y se mantuvieron en hielo para evitar su degradación. Se pipetearon 650 μ L de homogenado en un eppendorff y posteriormente se añadió el mismo volumen de ácido metafosfórico (MPA)* al 10%, se mezclaron las muestras y se mantuvieron en hielo 5 min.

A continuación, los homogenados desproteinizados fueron centrifugados a 15.000 g durante 30 min a 4°C . Del ultrasobrenadante obtenido se alícuotaron 4 eppendorffs con 250 μ L y se congelaron a -80°C .

*NOTA: la concentración final del MPA era del 5% y el homogenado estaba al 10% como resultado de la dilución.

3.5 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), el cual nos permite determinar la concentración de proteína soluble a través de la unión del colorante ácido con la solución de proteínas, y posteriormente

midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro. Los valores obtenidos se comparan con una curva estándar de BSA con valores de 0 a 1 µg/mL. En una placa se colocaron el patrón junto con las muestras y a continuación se preparó el reactivo BIORAD (Cat.No.500-0006) y seguidamente se leyó la placa en el lector TECAN a 595 nm. A la hora de realizar los cálculos se aplicó la ecuación de la recta para obtener las concentraciones en mg de proteína/mL de homogenado.

3.6 Daño oxidativo y sistemas antioxidantes

3.6.1 Biomarcadores de estrés oxidativo/nitrativo

A) Proteínas oxidadas (Ensayo AOPP)

Fundamento

El protocolo AOPP (Advanced Oxidation Protein Products) es un bioensayo que mide directamente la cantidad de proteínas oxidadas en muestras biológicas. El contenido de proteínas oxidadas se determina usando una curva patrón de Cloramina-T estándar (Barsotti et al., 2011). Las muestras o los estándares de cloramina se incuban con un reactivo iniciador de la reacción (que desencadena un proceso de desarrollo de color). Después de 5 min se para la reacción con ácido acético y se lee a 340 nm. Los reactivos que se han utilizado en este protocolo han sido: Cloramina-T estándar a 100 nM, reactivo iniciador de la reacción (1.16 M KI), PBS (phosphate buffered saline) y solución de parada (ácido acético).

Protocolo

En primer lugar se diluyeron las muestras 4 veces debido a que se encontraban muy concentradas y a continuación se preparó la curva patrón del ensayo, diluyendo la solución estándar de Cloramina-T hasta conseguir una solución de Cloramina-T 100 µL. Esta se prepara a partir de la solución de 100 µL de Cloramina-T comenzando por el punto más alto (VII) y haciendo diluciones a la mitad. En una placa de pocillos se pipeteó:

- ✓ 100 µL de muestra o patrón
- ✓ 5 µL de reactivo iniciador
- ✓ Se agitó durante 5 min en un agitador de placas
- ✓ 10 µL de ácido acético

✚ Se leyó a 340 nm a temperatura ambiente

Finalmente se expresaron los resultados en μM de Cloramina-T frente al blanco. Los resultados se expresaran en nmol de proteínas oxidadas por mg de proteínas totales.

B) TBARS

Fundamento

El estrés oxidativo da como resultado la formación de hidroperóxidos de lípidos que son altamente reactivos e inestables. La descomposición de los peróxidos inestables derivados de ácidos grasos poliinsaturados da como resultado la formación de muchos compuestos, como el malondialdehído (MDA), que se puede cuantificar colorimétricamente después de su reacción con el ácido tiobarbitúrico (TBA). Es un método que se utiliza para la detección y el seguimiento de la peroxidación lipídica y por lo tanto, se utiliza como un indicador indirecto de estrés oxidativo.

Los niveles de MDA se determinaron en las muestras que contenían tejido cerebral mediante el método del TBA. En condiciones ácidas y altas temperaturas el MDA reacciona con el TBA para dar lugar un componente de color rosa que puede cuantificarse por espectrofotometría (Uchiyama, 1978). Principalmente, en este ensayo se cuantifica MDA, pero se generan también otros productos durante la peroxidación lipídica, generalmente aldehídos, los cuales se agrupan dentro de las siglas TBARS (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico). Añadir que también mucho del MDA medido se produce por la descomposición de los lipoperóxidos formados durante la etapa de ebullición a pH ácido, sobre todo si no se han tomado precauciones como añadir un quelante de hierro y un antioxidante en este proceso.

Para finalizar, cuando más grande es el contenido de lípidos en la muestra biológica que se utiliza, más grande será la reactividad con el TBA (debido a la respuesta de ampliación que se produce al formarse más peróxidos durante el test), por el contrario, cuanto más grande sea la proporción de antioxidantes en la muestra, más bajo será el nivel de MDA.

Protocolo

Antes de proceder con el inicio del protocolo se re-disolvió el TBA mediante agitación y calor, además de preparar la centrífuga a 4°C y el baño seco a 95°C . Los reactivos que se utilizaron fueron: solución de TBA al 1.7%, solución de MDA $40 \mu\text{M}$, HCl 0.5 N y Butanol-1.

En primer lugar se realizó el banco de diluciones a la mitad partiendo de una concentración máxima de 10 μM de MDA hasta a 0 μM de MDA. En los tubos eppendorf se colocaron 50 μL del estándar o las muestras, 5 μL de HCl 0.5 N y 50 μL de TBA al 1.7%, y a continuación se agitó. Todos los tubos eppendorf se incubaron en el baño seco durante 10 min y una vez finalizó el tiempo se retiraron y se mantuvieron en hielo durante 5 min para parar la reacción.

Seguidamente se adicionaron 300 μL de butanol-1 y se volvió a agitar. Después se centrifugaron las muestras durante 10 min a 2000 rpm y a 4°C. La fase butanólica superior se leyó mediante fluorometría a una longitud de onda de 515 nm de emisión y 548 nm de excitación.

C) Nitritos totales

Fundamento

El óxido nítrico (NO) es un neurotransmisor atípico que no se encuentra almacenado en vesículas y regula la vasodilatación y permeabilidad vascular; es sintetizado a partir del complejo enzimático NO sintetasa (NOS) con una vida media de aproximadamente 40 s (Figura 11). Dicho proceso necesita 5 cofactores adicionales (FMN, FAD, Heme, Calmodulina y tetrahidrobioproteína) y dos cationes (calcio y grupo ferroso). Las isoformas neuronales, epiteliales y mitocondriales son dependientes del Ca^{++} pero las constitutivas de macrófagos y células endoteliales no lo son (Figueroa Vega et al. 2008). A pesar de que su vida media es corta, especialmente cuando hay presencia de macrófagos, grandes cantidades de NO lideran la interacción con enzimas pro-oxidantes que también son catalizadas generando superóxido y como producto final peroxinitrito (ONOO). Este es un fuerte radical libre que causa nitración proteica, ruptura de puentes de hierro y azufre, nitrosación de grupos tiol, y nitración de tirosina; por tanto hay una disfunción proteica a partir de una respuesta enzimática generada por el NO (Chen y col., 2011).

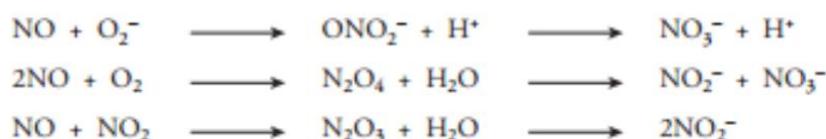


Figura 11: Diferentes reacciones del NO en procesos de oxidación con resultado de Nitritos y Nitratos.

Los productos finales de las interacciones de NO son nitrito (NO₂) y nitrato (NO₃), teóricamente la cantidad de cada residuo en organismos vivos debe sumar el total del NO que se tenía al inicio de la reacción.

Protocolo

El valor de los nitritos totales (NO_x, nitritos+nitratos) fue utilizado como marcador de los niveles de producción de NO mediante el método de Griess (Ricart-Jané y col., 2002). En soluciones acuosas el NO se degrada rápidamente a nitrito y nitrato. Así, mediante reducción todo nitrato es transformado en nitrito, que en medio ácido es convertido en ácido nitroso. Éste último, reacciona con la sulfanilamida y seguidamente con el N-(1-naftil)-etilenediamino produciendo un cromóforo cuya absorbancia es medida a 540 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro UV-1603 Shimadzu (Kyoto, Japón).

Óxido nítrico sintasa (NOS)

Para determinar la presencia de los diferentes miembros de la familia NOS, se observó en este estudio la expresión de la NOS inducible (iNOS) o NOS-2 y la xxx eNOS o NOS-3 por la técnica de Western Blot, cuyo protocolo será descrito en el correspondiente apartado.

3.6.2 Determinación de actividades enzimáticas

A) Superóxido dismutasa (SOD)

SOD es una metaloenzima que cataliza la conversión del radical superóxido (O₂⁻) en H₂O₂ y oxígeno molecular.



Para determinar la actividad de la SOD se utilizó la alícuota de homogenado que se reservó para ello a -80°C el día que se homogeneizó el tejido cerebral. En primer lugar, se realizó un ensayo preliminar para establecer la concentración de proteína adecuada para que la reacción enzimática se correspondiera con la parte lineal de la curva patrón. Luego se realizó la cuantificación de proteínas de las muestras mediante el método de Bradford para poder diluir las muestras con tampón GR (50 mM de fosfato

de sodio, 1 mM EDTA a pH 7.5) para obtener una concentración deseada de proteínas de 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Protocolo

Para la determinación de la actividad de SOD se utilizó un kit comercial de Arbor Assay. Este ensayo mide la actividad de todos los tipos de SOD. La recta patrón contenía valores de 4 a 0 (U/mL) y junto con las muestras se colocaron en placas transparentes de 96 pocillos, y justo antes de realizar la pre-lectura a 450 nm en el lector de placas TECAN se añadieron 50 μL de sustrato. A continuación se añadieron 25 μL de xantina oxidasa y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20 min. Las lecturas se realizaron a 450 nm en periodos de tiempo de cinco min y durante un tiempo total de 15 min y a una temperatura de 20 °C.

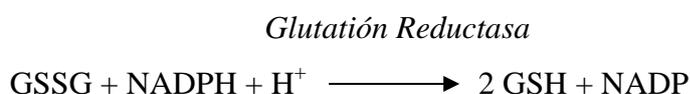
La actividad enzimática se correspondió con una curva logística de cuatro parámetros. Los resultados se analizaron mediante el programa Reader Fit usando los datos de la actividad enzimática del patrón para el ajuste. Finalmente se expresaron por mg de proteína.

Determinación de la actividad de la glutatión reductasa (GR)

La glutatión reductasa es una flavoproteína que se encuentra localizada en el citosol y su función principal es mantener los niveles intracelulares de GSH. GR cataliza la reducción de GSSG, utilizando NADPH como cofactor, dando lugar a dos moléculas de GSH. Esta enzima es esencial para el ciclo redox GSH, ya que mantiene niveles celulares adecuados de glutatión reducido. Un cociente alto de GSH/GSSG es esencial para la protección contra el estrés oxidativo.

Para cuantificar la actividad de GR se utilizó la alícuota correspondiente que se reservó a -80°C el día que se homogeneizó el tejido cerebral. En primer lugar, se realizó la cuantificación de proteínas de las muestras mediante el método de Bradford para poder diluir las muestras con tampón GR (50 mM de fosfato de sodio, 1 mM EDTA a pH 7.5) y así obtener una concentración de proteínas de 4 mg/mL.

El objetivo de la técnica es determinar la actividad del enzima GR que cataliza esta reacción:



La oxidación de NADPH a NADP⁺ se acompaña con un descenso en la absorbancia a 340 nm y es directamente proporcional a la actividad de GR en la muestra.

Protocolo

La determinación de su actividad se realizó con un kit comercial de Cayman Chemical (USA). Tanto a la recta patrón como a las muestras se les añadió NADPH justo antes de proceder a su lectura. Las lecturas se realizaron a 340 nm a intervalos de un min y durante un tiempo total de 5 min.

La actividad de la enzima GR se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad GR (nmoles/min/mL)} = \frac{\Delta \text{Abs } 240/\text{min}}{0,00373 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0,19 \text{ mL}}{0,02 \text{ mL}} \times \text{dilución de la muestra}$$

Determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx)

Existen dos formas de GPx: una dependiente de selenio y otra no dependiente de selenio. En este ensayo sólo se cuantificó la actividad de la GPx dependiente de selenio. La enzima GPx cataliza la reducción de hidroperóxidos, incluyendo peróxido de hidrógeno, a través de glutatión reducido y su función principal consiste en proteger a la célula frente al daño oxidativo. Todas las enzimas de GPx son tetrámeros de cuatro subunidades idénticas, excepto la GPx fosfolípido hidroperóxido que es un monómero. Cada subunidad contiene una selenocisteína en el sitio activo que participa en la reducción de los dos electrones del sustrato, en este caso el peróxido. La enzima utiliza el glutatión como un donador final de electrones para regenerar la forma reducida de la selenocisteína.

Para cuantificar la actividad de GPx a partir del homogenado de tejido cerebral, en primer lugar se realizó la cuantificación de proteínas de las muestras mediante el método de Bradford para poder diluir las muestras con tampón GR (50 mM de fosfato de sodio, 1 mM EDTA a pH 7.5) y así obtener una concentración deseada de proteínas de 4 mg/mL.

Este ensayo mide la actividad de la enzima indirectamente a través de una reacción acoplada con glutatión reductasa. El glutatión oxidado (GSSG), produce la reducción del hidroperóxido mediante GPx, y GR mediante NADPH lo recicla a su estado reducido (GSH).

Glutatión Peroxidasa



Glutación Reductasa

La oxidación de NADPH a NADP⁺ está acompañada con un descenso de su absorbancia a 340 nm.

Protocolo

La determinación de su actividad se realizó con un kit comercial de Cayman Chemical (USA). Tanto a las diluciones de la recta patrón como a las muestras se les añadió hidropéroxido de cumeno antes de proceder con las lecturas, las cuales se realizaron a 340 nm a intervalos de un min y durante un tiempo total de 5 min.

La actividad de la enzima GR se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad GPx (nmoles/min/mL)} = \frac{\Delta\text{Abs } 340/\text{min}}{0,00373 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0,19 \text{ mL}}{0,02 \text{ mL}} \times \text{dilución de la muestra}$$

Determinación de los niveles de GSH y GSSG**Fundamento**

El glutatión, principal antioxidante no enzimático del organismo, es un tripéptido que está compuesto por los aminoácidos cisteína, ácido glutámico y glicina. Según su estado de oxidación, puede encontrarse en su forma reducida (GSH), que es la forma activa, o en su forma oxidada (GSSG). La forma reducida, a través de su grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína, ejerce un papel protector frente a ROS.

Los niveles de GSH y GSSG se determinaron de acuerdo al método descrito por Hissin (1976). Este método se basa en la capacidad del fluoróforo o-ptaldehído (OPT) para reaccionar con aminos primarias de grupos tiol, generando un producto que emite fluorescencia y que se mide a una longitud de onda de excitación de 350 nm y emisión de 420 nm.

GSH reacciona de forma inespecífica con OPT a pH 8.0 mientras que el GSSG lo hace a un pH de 12. Para prevenir esta conversión, en la determinación de GSSG, se añade a cada muestra N-etilmaleimida (NEM) que reacciona con GSH para formar un complejo estable. De esta forma se obtienen valores reales de GSSG y así se obvia la oxidación de GSH a GSSG que se produce a pH superiores de 8 (Hissin, 1976).

Determinación de GSH

En primer lugar, se diluyó a 1/50 la solución GSH 10 mM con tampón fosfato de sodio 0.1 M (0.2 M NaH_2PO_4 + 0.2 M Na_2HPO_4 + 0.005 M EDTA a pH 6.8) para obtener una solución de GSH 200 μM . Se agitó y se mantuvo en hielo. A continuación, se diluyó la solución de GSH 200 mM, y la muestra 1/10 con el tampón fosfato de sodio 0.1 M. Se realizó la recta patrón que contenía valores de 0 a 1 nmol de GSH. Para medir los valores de GSH, se adicionaron 100 μL de la muestra, 100 μL de tampón fosfato de sodio y 40 μL de una solución OPA (concentración 1 mg/mL en metanol) y se mantuvo la placa en incubación durante 15 min a temperatura ambiente. La fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 350 nm y a una longitud de onda de emisión de 420 nm.

Determinación de GSSG

El mismo día del ensayo, se diluyó la solución GSSG 1 mM con NaOH 0.1 N para obtener una solución de GSSG 50 μM . Se agitó y se mantuvo en hielo. Se tomaron 100 μL del stock diluido GSSG 50 μM o del sobrenadante de la muestra y se mezclaron con 40 μL de NEM. Se dejó incubar la mezcla durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación se diluyó la muestra 1/10 con tampón NaOH 0.1 M y se agitó. Se realizó la recta patrón que contenía valores de 0 a 0.25 nmol de GSSG. Para medir los valores de GSSG, se cargaron 200 μL de muestra en cada pocillo y se midió la fluorescencia en una longitud de onda de excitación de 350 nm y a una longitud de onda de emisión de 420 nm.

Cálculos

Los niveles de GSH y GSSG en cada una de las muestras se determinaron por interpolación de sus correspondientes valores de fluorescencia y de sus rectas patrón a partir de concentraciones conocidas de GSH y GSSG. Las cantidades de GSH y GSSG, expresadas en nmoles, se normalizaron por la cantidad de proteína de cada muestra. Los resultados se expresaron mediante el coeficiente GSH/GSSG. En una situación de estrés oxidativo, la concentración de glutatión oxidado se encuentra aumentada y se altera el estado redox del glutatión, disminuyendo el coeficiente GSH/GSSG.

3.7 Homogenización del tejido para Western blot

Los cerebros se lavaron con solución amortiguadora de lisis (RIPA) pH 7,5 (50 mM de Tris a pH 7,4, 150 mM de NaCl 150 mM, 1% de DOC, 0,1% SDS, 1% de Triton X-100 y NaF 5mM), con cóctel inhibidor de proteasas (1:25) (que contiene aprotinina, leupeptina, pepstatina, dithiothreitol, iodoacetamida, flourido de fenilmetilsulfonil y ortovanadato de sodio; Sigma). El tejido se homogenizó pulverizándolo primero con nitrógeno líquido en mortero y después usando un homogenizador de vidrio con capacidad para 5 ml en solución buffer de RIPA (1:5). Los extractos se limpiaron por centrifugación a 12.000 g durante 20 min a 4 °C. Y el sobrenadante conteniendo el total de proteínas fue separado en alícuotas de muestras preparadas que se mantuvieron congeladas en -80 °C hasta su análisis por Western blot.

3.7.1 Análisis de Western blot

La concentración de proteínas de los lisados preparados previamente fue determinada por el método Bradford (1976) usando un espectrofotómetro TECAN.

A partir de dichos lisados de cerebro de las ratas, se tomaron 50 µg de proteínas extraídas y se les adicionó un volumen de buffer Laemli SDS 3x (0,125 M Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 10% glicerol, 0,001% azul de bromofenol y 5% 2-mercaptoetanol), correspondiente al 10% del peso húmedo de la muestra. Tras centrifugar el lisado durante 15 min a 4°C, el sobrenadante fue mezclado con tampón de carga SDS 1x (dodecil sulfato de sodio) y calentado durante 5 min a 95°C. A continuación, las muestras se cargaron en geles de poliacrilamida 8-15% (Acrilamida: N,N`-Metilene-bis-acrilamida, Cat. #161-0154; Bio-Rad Laboratories, USA) después de dejar enfriarlas. Paralelamente se cargó un marcador de peso molecular (rango 10-250kDa; Cat. #161-0373, Bio-Rad, USA). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 125V durante 1,5 h (Tampón de electroforesis: Tris 125 mM, Glicina 1,25 M, SDS 0,5%) y posteriormente las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de PVDF (Polyvinldene fluoride) (Immobilon-P, poro 0,45 µm, Milipore, Bedford, MA, USA) durante una noche a 4°C y a un voltaje constante de 35 V (Tampón de transferencia: Tris 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 20%). Con las membranas se aplicó el siguiente protocolo:

-
- PBS 3 lavados de 10 min
 - Solución de bloqueo 10% 2 h a temperatura ambiente
(leche descremada en polvo 5 - 10% en PBS-Tritón[®] X100 0,05% (PBST))
 - PBST 3 lavados de 10 min
 - Solución de bloqueo a 5% con 2 h a temperatura ambiente o toda la
noche a 4°C con el anticuerpo primario
 - PBST 3 lavados de 10 min
 - Solución de bloqueo a 5% con el 90 min a temperatura ambiente
anticuerpo secundario
 - PBST 3 lavados de 15 min
 - Revelado:

Para revelar las membranas se utilizó un sustrato de quimio-luminiscencia utilizando un kit comercial (Pierce ECL WB Substrate, Thermo Scientific, Alcobendas, Spain) al cual se expusieron las membranas por 1 min, tras lo cual se colocaron dentro de un casete para revelado de filmes de Rayos X. En un cuarto oscuro la membrana estuvo en contacto con el film fotosensible (Medical X-ray film, Kodak, Spain) por un periodo entre 10 s y 5 min antes del revelado. Las bandas mostraron un patrón según el anticuerpo utilizado, fueron escaneadas en matices de gris y sometidas a análisis densitométrico que se realizó mediante el software Image-J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Los valores encontrados de la proteína β -Actina fueron evaluados para cada membrana, y se utilizó como control de la cantidad de proteína utilizada por la técnica a presentada. Las membranas que fueron reutilizadas pasaron por una solución de stripping (Restore Western Blot Stripping Buffer, Thermo Scientific, Alcobendas, Spain) e incubadas durante 10 min en agitación a temperatura ambiente.

Listado de Anticuerpos

Anticuerpos	Referencia y casa comercial	Dilución
Primarios		
anti-HIF-1 α	sc-10790, Santa Cruz *	1:400
anti-eNOS	sc-654, Santa Cruz *	1:400
anti- iNOS	sc-8310, Santa Cruz *	1:400
anti-Citocromoc	sc-13561, Santa Cruz *	1:100
anti-AIF	sc-9416, Santa Cruz *	1:200
anti- Cleaved Caspasa3	#9661S, Cell Signaling	1:1000
anti-NF-kBp50	sc-33022, Santa Cruz *	1:400
anti-Epo	sc-795216, Santa Cruz *	1:300
anti-VEGF	sc-152, Santa Cruz *	1:200
anti-HSP70	sc-1060, Santa Cruz *	1:200
anti-HSP27	sc-1048, Santa Cruz *	1:200
anti- β -actina	sc-130656, Santa Cruz *	1:400
*Santa Cruz, Biotecnología, CA, EE.UU		
Secundarios		
Goat Anti-rabbit IgG-HRP	111-035-003, Jackson Immuno Research	1:60.000
Goat Mouse IgG-h+I HRP	A090-116P, BETHYL laboratories	1:15.000
Rabbit Anti-Goat IgG-HRP	sc-2768, Santa Cruz Biotecnología	1:10.000

Tabla 1: Anticuerpos y diluciones utilizadas para la realización de los Western blot.

3.8 Inmunohistoquímica

3.8.1 Obtención de las muestras

Las ratas fueron anestesiadas y perfundidas transcárdialmente con paraformaldehído al 4% en solución salina tamponada-fosfato (PBS, pH 7.4) inmediatamente después de pasar por la hipoxia y re-oxigenación según el correspondiente grupo experimental: Control, H, RO-1 y RO-2 en el Experimento 1; y Control, HS, HHI, HHI + HS en el Experimento 2.

- Goat anti-HSP27 (dilución 1:250; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz CA)
- Rabbit anti-GFAP (dilución 1:1000; DAKO, Glostrup, Denmark)
- PBS 3 lavados de 10 min
- Solución con el anticuerpos secundarios 2 h a temperatura ambiente
5% FBS Tritón® X 100,01% en PBS gelatina 0,2%.

Se utilizaron tres anticuerpos secundarios en función de la especie donde se produjeron los anticuerpos primarios:

- Goat anti-Rabbit biotinilado (dilución 1:200; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Horse anti-Mouse biotinilado (dilución 1:200; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Rabbit anti-Goat biotinilado (dilución 1:200; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- PBS 4 lavados de 5 min
- Solución ABS (abidin-biotin complex) 2 h a temperatura ambiente
 - 5% FBS
 - Tritón® X 100,01%
 - en PBS gelatina 0,2%
 - Advina (dilución 1:400, Vector Labs, USA)
 - Biotina (dilución 1:400, Vector Labs, USA)
- PBS 4 lavados de 5 min
- Revelado

Solución de Revelado:

- Diaminobenzidina (DAB) 0,05%
- H₂O₂ 0,01% , en PB 0,1M, pH7,2

-
- | | |
|---|--------------------|
| - PBS 0,1M, pH 7,2 | 5 lavados de 5 min |
| - Montaje de los cortes en portas gelatinizados | |
| - Dejar secar | |
| - Agua desionizada | 5 min |
| - Etanol 70% | 5 min |
| - Etanol 80% | 5 min |
| - Etanol 90% | 5 min |
| - Etanol 96% | 5 min |
| - Etanol 100% | 5 min |
| - Xilol | 5 min |

Finalmente se hacía el montaje con Eukitt® o DPX. Las secciones se fotografiaron usando una cámara digital (Leica DFC 490) acoplada a un microscopio (Leica DM 6000B) a un aumento de 2x, 4X y 10X, y las imágenes fueron digitalizadas.

3.9 Análisis estadístico

Para la comparación estadística se utilizó el programa estadístico SPSS17.0® (SPSS Ibérica, Madrid, España) para Windows. Se empleó un test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para evidenciar la distribución normal de los valores medios de las muestras evaluadas. Fue utilizado el test paramétrico one way ANOVA y el análisis *post hoc* usando el test de Bonferroni para la realización de los tests de hipótesis de comparación entre los grupos. Fue considerado como significativo para la no aceptación de la hipótesis nula un valor de $p \leq 0.05$. Los resultados de los niveles de las proteínas evaluadas fueron expresados como media \pm error de la media (SEM). Para la comparación entre dos grupos fue aplicado el test t de Student. Por su parte, el estudio de la existencia de posibles correlaciones entre variables fue realizado mediante la prueba de Pearson.

IV.-Resultados

4. Resultados

Para el desarrollo de esta tesis planteamos dos grupos de experimentos. En el primero, (experimento 4.1) caracterizamos el efecto en el cerebro de ratas expuestas a una hipoxia respiratoria aguda (6 horas) severa ($FiO_2 = 7\%$ de O_2) seguido de un periodo de re-oxigenación de 48 h. Valoramos el estrés oxidativo e indicadores de la disfunción mitocondrial y de apoptosis. En el segundo, caracterizamos el efecto de la exposición intermitente a hipoxia hipobárica aguda (4 h) moderada (altitud simulada de 4.000 m sobre el nivel del mar) en el cerebro y el efecto de la exposición a hipoxia hipobárica intermitente sobre el efecto de la exposición a hipoxia respiratoria aguda severa.

4.1 Experimento 1: Ratas expuestas a hipoxia normobárica aguda (6 h) severa (7% FiO_2) con diferentes tiempos de re-oxigenación (0 horas, 24 horas y 48 horas)

4.1.1 *La exposición a hipoxia respiratoria aguda severa causa hipoxia en el cerebro*

Un experimento preliminar era realizado para determinar la eficacia del protocolo de hipoxia descrito en inducir hipoxia en el cerebro.

Un grupo de 5 ratas eran previamente anestesiadas con halotano (4%) y canuladas en la arteria femoral izquierda. Cuatro días después de la canulación, se obtenían muestras de sangre en normoxia y a las 4 h de exposición a hipoxia normobárica severa (7% de O_2). El contenido de gases (PaO_2 y $PaCO_2$), la saturación de oxígeno y el pH en la sangre arterial eran determinados desde la sangre arterial de cada muestra usando ABL 510 (Radiometer, Dinamarca).

Los resultados (Tabla2) muestran que la exposición a las condiciones de hipoxia reseñada provoca una disminución significativa en la presión de O_2 (PaO_2) y en la saturación de O_2 (SaO_2) en la sangre arterial. Estos valores confirman que la exposición a la hipoxia descrita causa una hipoxia tisular severa.

	Normoxia	Hipóxia
Hematocrito %	37 ± 2.3	38 ± 2
PaO ₂ (mmHg)	105 ± 3	46 ± 3 ***
SaO ₂ (%)	99 ± 1	52 ± 2 ***
PaCO ₂ (mmHg)	43 ± 2	25 ± 2 **
pH	7.35 ± 0.03	7.30 ± 0.1

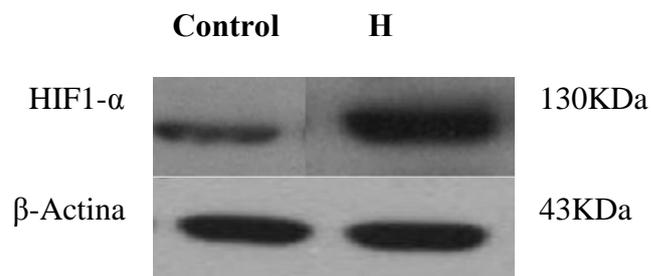
Tabla 2: Parámetros biológicos de ratas sometidas a 7% de FiO₂ (H) y del grupo normóxia (FiO₂ de 20,93%). Representan la Media ± Desviación Estándar de la Media (DEM) obtenidas a partir de 5 muestras en cada caso. La confianza estadística está valorada mediante test post hoc Bonferroni, siendo **p ≤ 0.01 respecto al control. ** p < 0.01 y *** p < 0.001.

Detección de la expresión de HIF-1 α

Para corroborar con estos resultados y confirmar que el cerebro estuvo expuesto a la hipoxia, se analizó la expresión de HIF-1 en el cerebro de los animales, tanto de control como de hipoxia. Los resultados muestran que la exposición de 6 h de hipoxia severa (7% FiO₂) causa un aumento significativo de los niveles de HIF-1 en el cerebro de ratas hipóxicas frente a cerebro de ratas de normoxia (Figura 12).

HIF-1 α

(A)



(B)

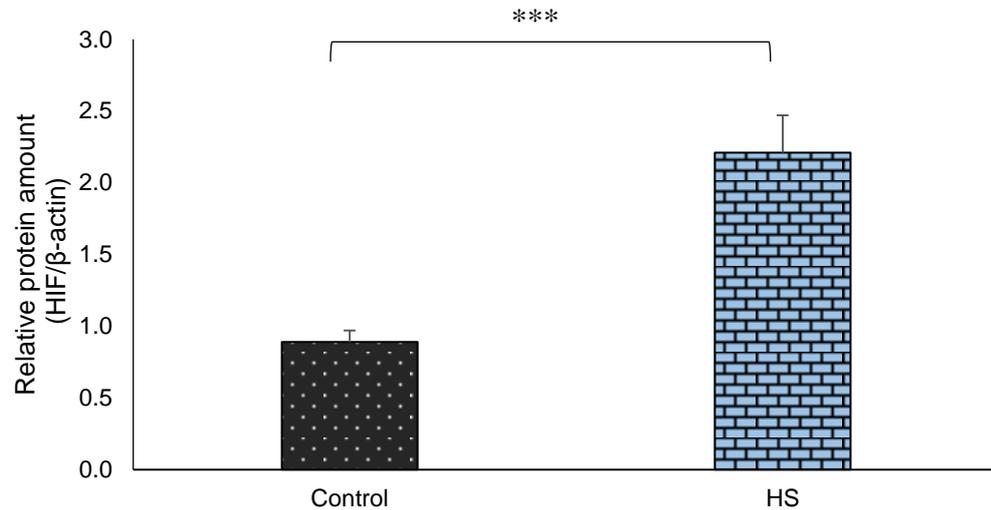


Figura 12: – Expresión de los niveles de HIF en el cerebro de ratas expuestas a hipoxia severa (H). (A) Western Blot para la detección de la expresión de la proteína HIF1- α , expresión relativa del fragmento de 130KDa respecto a la banda que corresponde a HIF1- α . (B) Representación gráfica de los grupo control y H, en condiciones de normoxia existe un nivel basal de la proteína en las células cerebrales, pero una vez estas células experimentan un fenómeno hipóxico, su expresión aumenta hasta niveles significativos (0.89 ± 0.08 control y 2.21 ± 0.26 H valores relativos de proteínas). Con lo que queda demostrado que en este estudio que las células cerebrales experimentaron hipoxia. La β -actina se utilizó como control interno para la concentración de proteínas. Los valores están expresados por DEM ***p < 0.001.

4.1.2 Marcadores de Estrés Oxidativo: La hipoxia aguda severa causa estrés oxidativo en el cerebro.

Las neuronas son muy susceptibles al estrés oxidativo (Wang y Michelis, 2010). La alteración del equilibrio pro-oxidantes/antioxidantes puede llevar al daño celular, entre otros mecanismos por el aumento de la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y aumento de los niveles de óxido nítrico en el tejido cerebral.

TBARS

La hipoxia aguda severa induce a un incremento significativo ($p < 0.001$) en los niveles de TBARS, un indicador de la peroxidación de lípidos (Chen y col., 2009) inmediatamente después de la exposición hipoxia (0.505 ± 0.05 nmol / mg de proteína en el grupo H vs. 0.292 ± 0.03 nmol / mg de proteína en el grupo control) (Figura 13), mientras que los valores de TBARS después de 24 h (RO-1) y 48 h (RO-2) de re-oxigenación (0.334 ± 0.036 nmol/ mg de proteína y 0.316 ± 0.009 nmol/ mg de proteína, respectivamente) no mostró diferencias significativas en comparación con el grupo control. Los resultados indican que la exposición a la hipoxia induce un aumento de la peroxidación de lípidos en el cerebro que disminuye a valores de normoxia después de 24 h y 48 h de re-oxigenación.

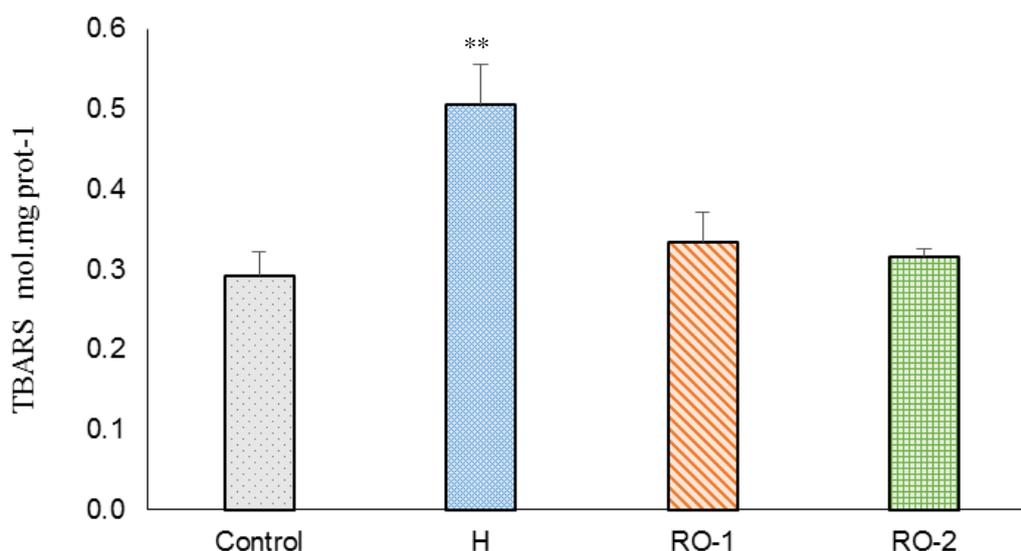


Figura 13. Efecto de la hipoxia y la reoxigenación en la peroxidación lipídica en homogenado de tejido cerebral indicando un aumento significativo en el grupo H, inmediatamente después del protocolo de hipoxia aguda aplicado. Los valores están expresados estadísticamente por la media \pm DEM, siendo $**p \leq 0.01$. (n=6).

Oxidación de Proteínas: Valoración por AOPP

El aumento de radicales libres pueden causar la oxidación de proteínas estructurales. Para valorar el daño oxidativo a las proteínas de los homogenizados de cerebro, se aplicó la determinación del protocolo AOPP (Advanced Oxidation Protein Products), un bioensayo que mide directamente la cantidad de proteínas oxidadas en

muestras biológicas. La hipoxia causa un aumento significativo en los niveles de proteínas oxidadas con relación al grupo control (78.8 ± 3.13 vs. 45.85 ± 4.27 nmol/mg de proteína en el grupo H y grupo control respectivamente), mientras después de 24 h (RO-1) y de 48 h (RO-2) de re-oxigenación hay una reducción significativa de los niveles de proteínas oxidadas (proteína 55.4 ± 3.0 y 52.7 ± 1.5 nmol/mg, respectivamente) con relación a la hipoxia (H) (78.8 ± 3.13 nmol/mg de proteína) (Figura14).

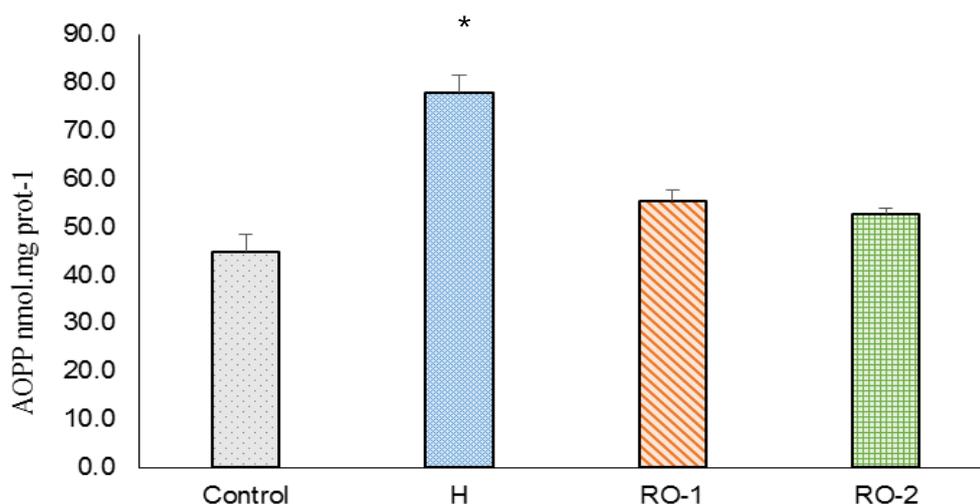


Figura 14: – La hipoxia (H) aumenta la oxidación de proteínas en el cerebro mientras que la re-oxigenación después de 24 h (RO-1) y 48 h (RO-2) reduce la oxidación de las proteínas. La oxidación de proteínas es determinada valorando el contenido de AOPP. Los valores están expresados estadísticamente por la media \pm DEM, siendo $*p \leq 0.05$. (n=6).

Los resultados de los marcadores de estrés oxidativo tisular AOPP y TBARS demuestran que la exposición a la hipoxia aguda causa estrés oxidativo y que después de 24 h y 48 h de re-oxigenación los efectos de la hipoxia retornan a los valores basales.

Formación de óxido nítrico

Durante el estrés oxidativo, el superóxido formado principalmente durante el transporte de electrones en la mitocondria, si no es catalizado por la SOD, puede reaccionar rápidamente con el NO y formar peroxinitrito, un radical muy reactivo capaz de oxidar sustratos biológicos (Lipton y col., 1993; Quijano y col., 1997 y dañar a las mitocondrias (Heales y Bolaños, 2002). El NO es un radical libre que tiene una vida media corta debido a su reactividad con otros componentes intracelulares, tales

como el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). La reacción entre el NO y $O_2^{\bullet-}$ causa la formación del anión peroxinitrito ($ONOO^-$), que es citotóxico (Lipton y col., 1993).

Puesto que el NO tiene una vida media muy corta, para su cuantificación es aceptado cuantificar los productos finales de su reacción, nitritos y nitratos (NOx). Los niveles de óxido nítrico que se obtuvieron presentan valores significativos en todos los grupos respecto al grupo control (Figura 15). La hipoxia (H) induce un aumento significativo ($p < 0.01$) de los niveles de nitrito y nitrato (NOx) (8.163 ± 0.38 nmol/ mg de proteína vs 11.549 ± 0.83 nmol/mg de proteína en grupos de control y en el grupo H, respectivamente). Después de 24 h (RO-1) y 48 h de la re-oxigenación (RO-2) el contenido de NOx volvió a los valores basales (Figura 15).

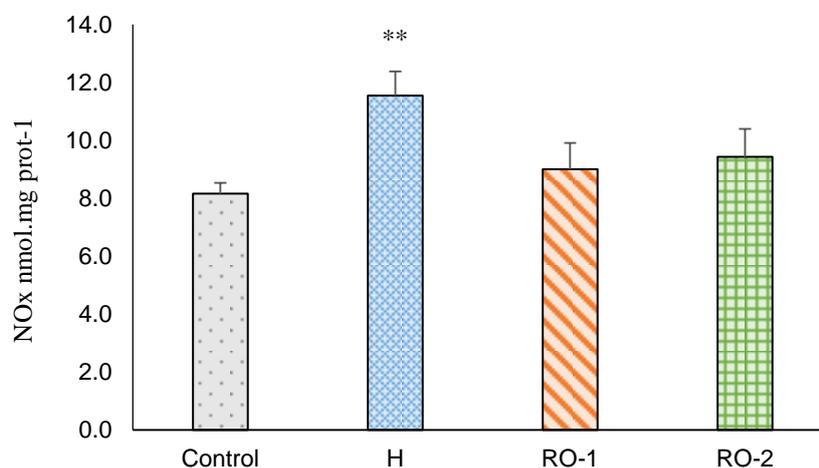


Figura 15: La hipoxia induce un aumento de los niveles de derivados de óxido nítrico (NOx) en el cerebro que es reducido durante la reoxigenación. La concentración de nitritos y nitratos era determinada con metabolitos del NO. Valores de NOx expresados en la media \pm DEM, siendo respecto al $**p \leq 0.01$. (n=6).

4.1.3 Actividad Antioxidantes

El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio entre elementos antioxidantes y oxidantes. Los ROS son generados continuamente durante el metabolismo oxidativo en la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Para evitar el efecto tóxico de los ROS, las células disponen de mecanismos antioxidantes que en condiciones fisiológicas mantienen la homeóstasis redox celular. Los principales

antioxidantes en las neuronas son las superóxido dismutasas (SODs) y el sistema glutatión.

El primer ROS que se forma durante el metabolismo oxidativo es el ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Las SODs neutralizan el $O_2^{\bullet-}$ a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). La hipoxia causa una disminución significativa de la actividad de la SOD (1.52 ± 0.09 U/mg de proteína en el control vs. 1.10 ± 0.05 U/mg de proteína en el grupo H) (Figura 16). La disminución de la actividad de la SOD se mantenía a las 24 h de reoxigenación (RO-1) (1.08 ± 0.10 U/mg proteína) para recuperar los valores basales después de 48h de reoxigenación (RO-2) (1.69 ± 0.15 U/ mg de proteína).

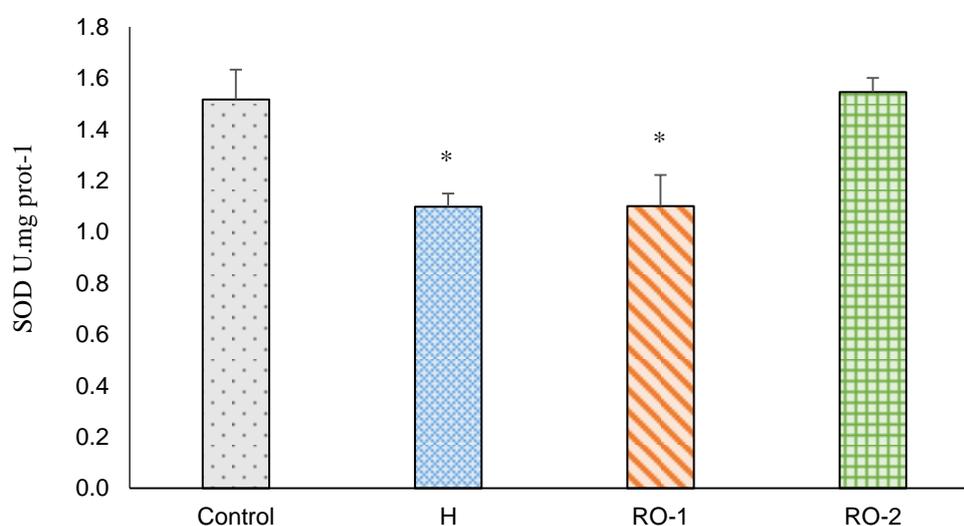


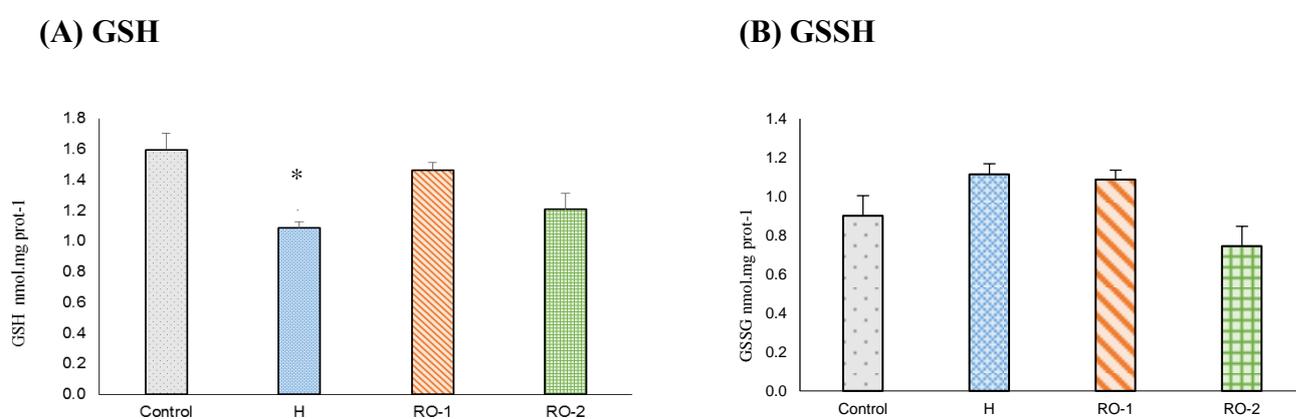
Figura 16: La hipoxia causa una reducción de la actividad de la SOD en el cerebro. La reducción se mantiene después de 24 h de re-oxigenación y recupera la actividad normal a las 48 h de reoxigenación. Siendo significativo en los grupos H y RO-1 cuando comparados al grupo control. Valores de SOD son expresados en la media \pm DEM, siendo $*p \leq 0.05$. (n=6).

Sistema Glutatión

El sistema de glutatión es especialmente importante para la defensa celular contra ROS. La forma reducida de GSH, un importante antioxidante intracelular en el cerebro, reacciona no-enzimáticamente con radicales (R^{\bullet}) convirtiéndose en la forma reducida (GSSG) y es el donante de electrones para la reducción de peróxidos (ROOH) en la reacción catalizada por el enzima glutatión peroxidasa (GPx). GSH es regenerada desde GSSG por el enzima glutatión reductasa (GR) que usa NADPH como cofactor.

La exposición a la hipoxia respiratoria induce en el cerebro una disminución en los niveles de la forma reducida de GSH en un 29% (1.55 ± 0.07 nmol / mg de proteína en el grupo control frente a 1.08 ± 0.04 nmol/mg de proteína en el grupo H) (figura 17A), mientras que la forma oxidada GSSH muestra un ligero aumento (Figura 17B) que conduce a una disminución en la relación GSH /GSSG (1.63 ± 0.05 nmol/mg proteína en el grupo control frente a 0.94 ± 0.08 nmol/mg proteína en el grupo H (Figura 17C). Después de 24 y 48 h de reoxigenación hay una recuperación de los valores de GSH. La relación GSH/GSSG disminuida durante la hipoxia también tiende a recuperarse durante la re-oxigenación después de 48h (RO-2) logrando valores similares a los niveles basales (1.64 ± 0.073 y 1.62 ± 0.046 nmol / mg de proteína) grupo RO-2 y Control respectivamente. (Figura 17C.)

La GPx puede contribuir a la oxidación de GSH por radicales peróxidos. Hay una tendencia a disminuir la actividad GPx no significativa durante la hipoxia que aumenta a las 24 h de re-oxigenación (RO-1) y es significativa a las 48 h de re-oxigenación (RO-2) (Figura 18).



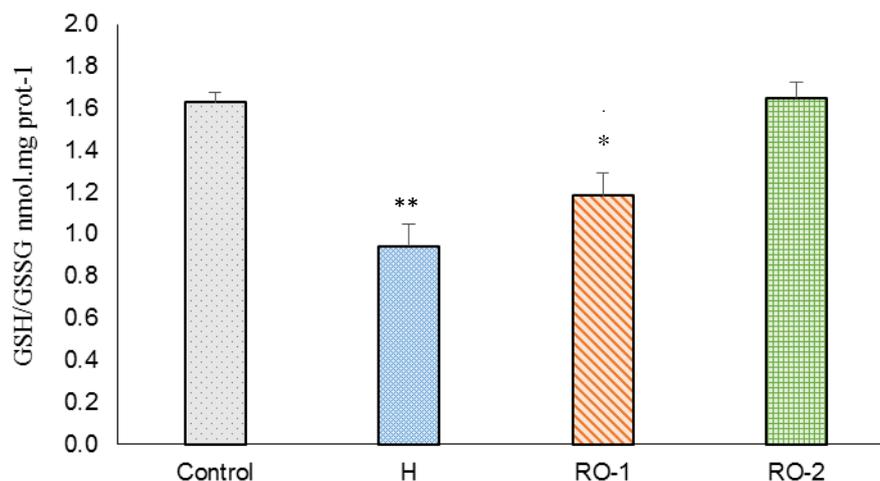
(C) GSH/GSSH

Figura 17: (A) hipoxia causa una disminución significativa de los niveles de GSH. Después de 24 h (RO-1) y 48 h (RO-2) los niveles de GSH no difieren de los niveles de GSH en los animales normóxicos. * $p < 0.05$ de H vs control (B) La hipoxia causa un ligero aumento no significativo de los niveles de GSSG que se mantiene después de 24 h de re-oxigenación. (C) La hipoxia induce una reducción significativa de la relación GSH/GSSG con relación a la del grupo control que se mantiene después de 24 h de reoxigenación (RO-1) y retorna a valores normales a las 48 de re-oxigenación. * $p < 0.05$ RO-1 vs control; ** $p < 0.01$ H vs control. Los datos expresan nmol/mg proteína. Los valores están expresados estadísticamente por la media \pm DEM (n=6), siendo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

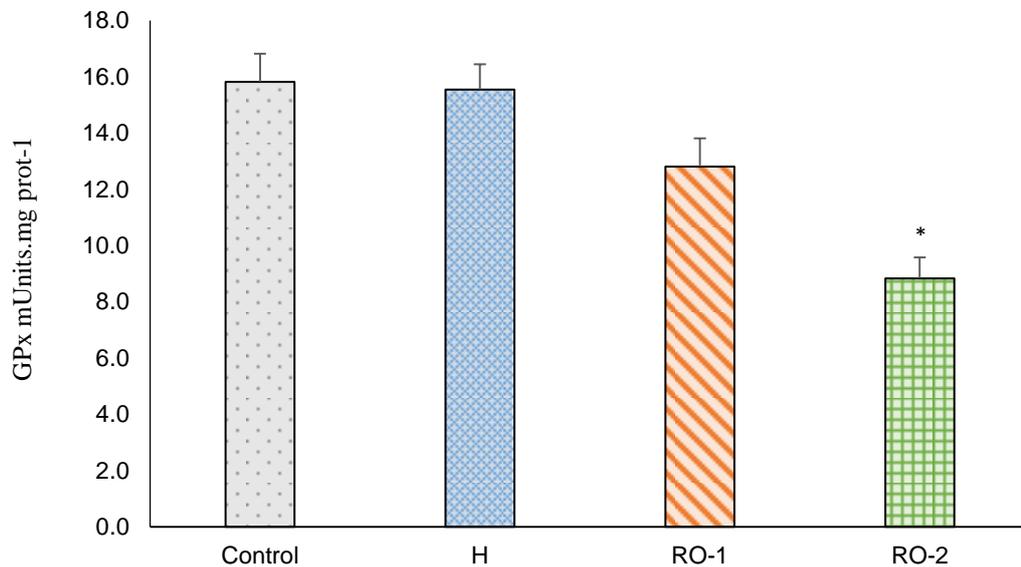
GPx

Figura 18: La hipoxia induce una disminución significativa de los niveles de GPx después de 48 h de reoxigenación (grupo RO-2). Después de 6 h de hipoxia (grupo H) y de 24 h de reoxigenación (grupo RO-1) no hay cambios significativos en relación con el grupo control. Los valores están expresados estadísticamente por la media \pm DEM (n=6), siendo * $p < 0.05$.

GR

Otra enzima implicado en el mantenimiento del sistema glutatión es la glutatión reductasa (GR), encargada de la recuperación del nivel de GSH desde GSSG. La hipoxia induce una reducción de la actividad del 34% (6.56 ± 0.2 mU/mg de proteína en el grupo control frente a 4.39 ± 0.2 mU / mg de proteína en el grupo H) (Figura 19). Durante la re-oxigenación la GR vuelve a valores normales.

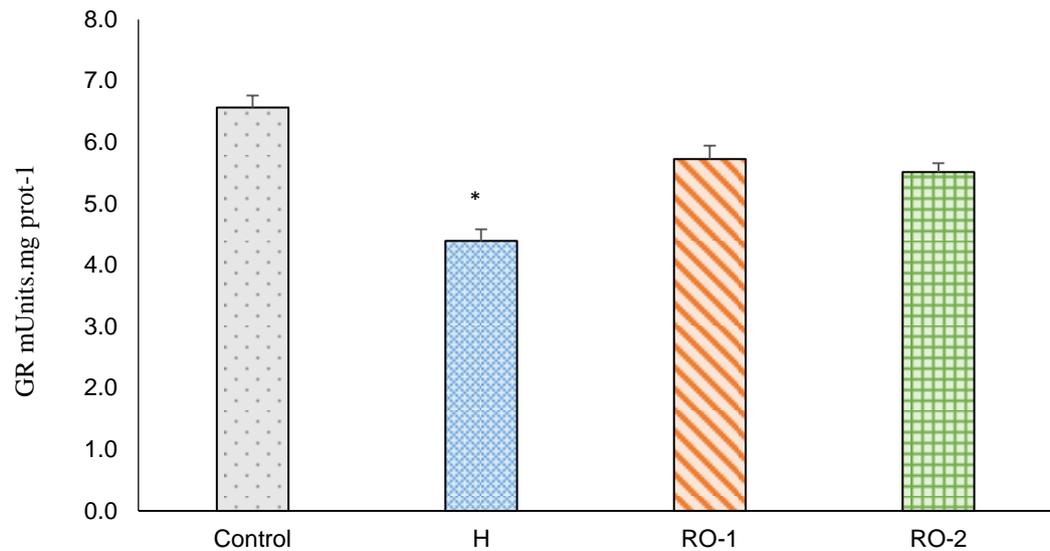


Figura 19: La hipoxia induce una disminución de los niveles de GR. Después de 24 h y 48h de re-oxigenación los niveles vuelven a los valores normales. Los valores están expresados estadísticamente por la media \pm DEM, siendo $*p < 0.05$. (n=6).

4.1.4 Expresión de Proteínas Inductoras de Apoptosis

Los radicales libres, además actuar directamente dañando macromoléculas estructurales que pueden llevar a la muerte celular por necrosis, de forma indirecta pueden también causar daño en las mitocondrias e inducir la vía intrínseca apoptótica que lleva a la muerte celular por apoptosis. Como indicadores de la disfunción mitocondrial valoramos la presencia de citocromo c en el citosol y del Factor de Inducción de Apoptosis (AIF). La caspasa 3 es el principal ejecutor de la vía apoptótica.

Citocromo C

La hipoxia aumenta significativamente los niveles de citocromo c. Después de 24 h de re-oxigenación hay una disminución en los niveles de citocromo c pero que todavía son significativamente mayores que los niveles de normoxia (grupo control). Después de 48 h los niveles de citocromo c eran similares a los niveles del grupo control (Figura 20).

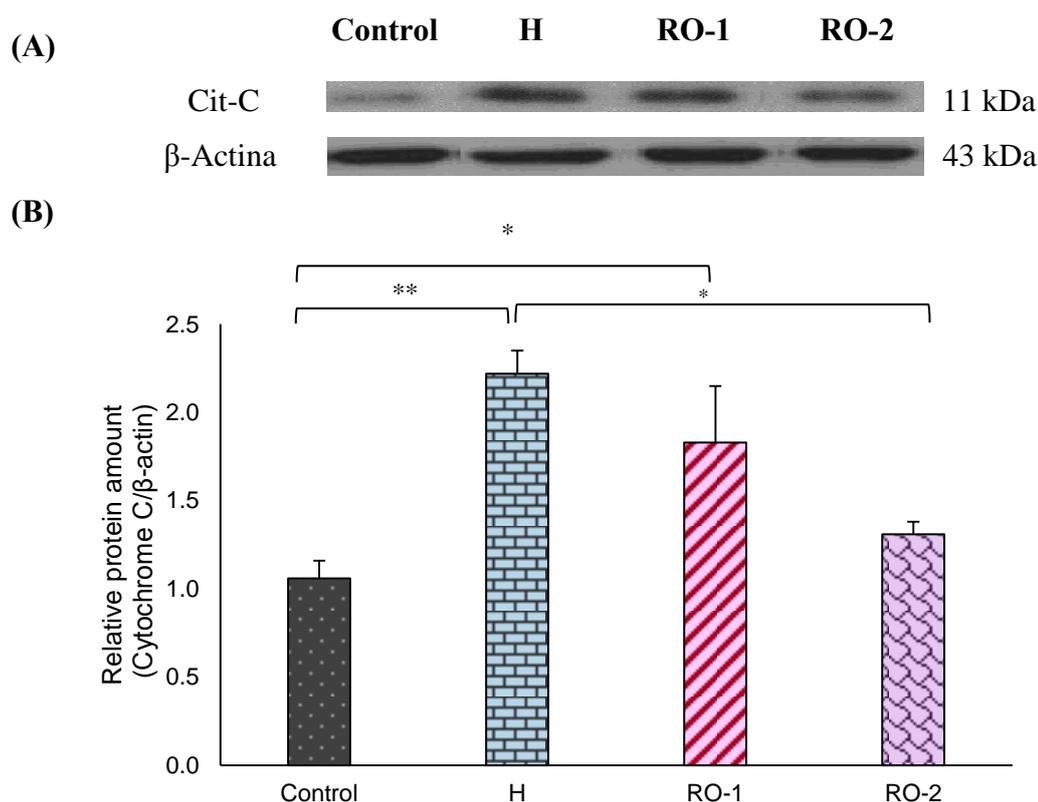


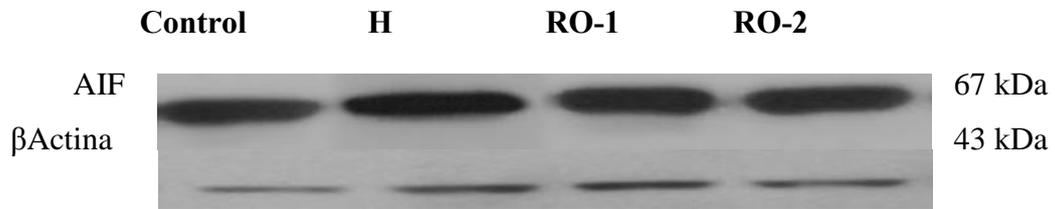
Figura 20: Expresión de los niveles de citocromo c en el cerebro de ratas expuestas a la hipoxia y después de 24 h y 48 h de reoxigenación. (A) Western Blots representativos de la presencia de citocromo c. β -actina se utilizó como control interno para la concentración de proteínas.. (B) Análisis de la densidad óptica de las bandas usando el software Image J. Los cambios son expresados como cantidades relativas de proteína. Los valores están expresados estadísticamente por la media \pm DEM (n=6), siendo * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$.

AIF

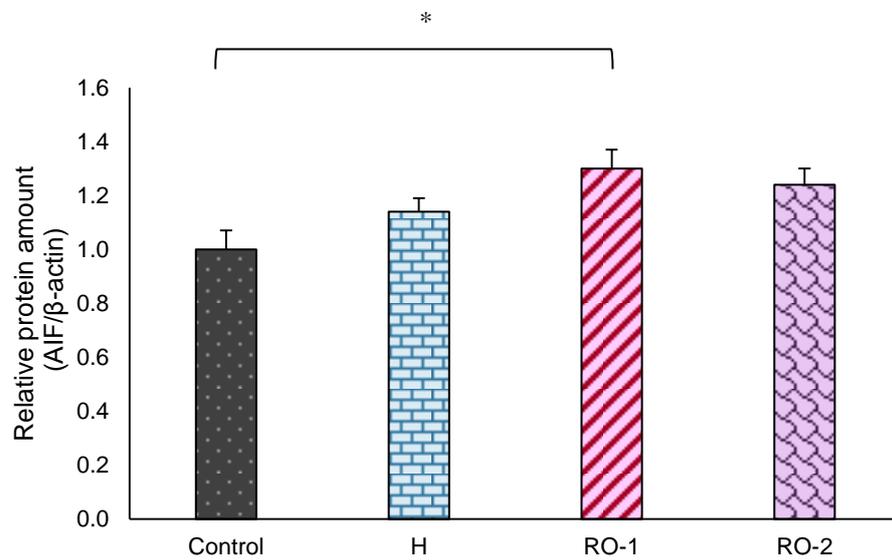
El Factor Inductor de Apoptosis (AIF) es una proteína normalmente residente en el espacio intermembrana y se libera al citosol por la mitocondria a causa de alteración de la membrana mitocondrial. Después de 6 h de exposición a la hipoxia no se observan cambios significativos de los niveles de AIF en el cerebro. Hay un aumento significativo de los niveles de AIF a después de 24 h de reoxigenación (grupo RO-1) con relación al grupo control y el aumento se mantiene después de 48 h de reoxigenación (grupo RO-2. (Figura 21A y B). Estos datos son corroborados con la valoración inmunohistoquímica. La inmunoreactividad del AIF en cortes coronales del cerebro, muestra cambios en la expresión de la proteína en los grupos H, RO- 1 y RO-2, pero el grupo H a presenta algunas neuronas con una morfología diferente a la de los

grupos RO-1 y RO-2, principalmente en neuronas de la zona CA3 del hipocampo, el incremento de expresión se observa principalmente en los cerebros del grupo RO-2 cuando comparado los cortes cerebrales del grupo control. (Figura 21C).

(A)



(B)



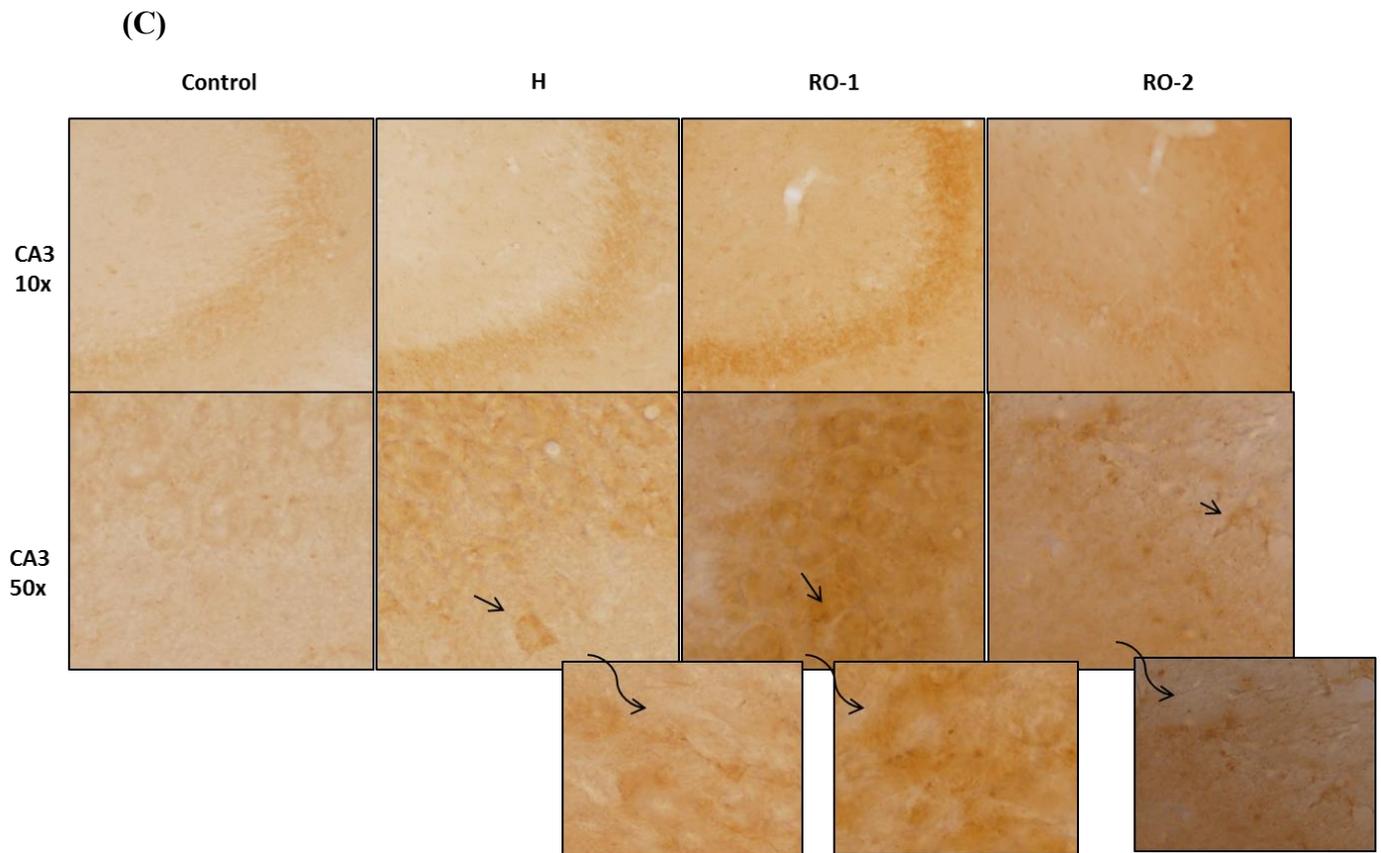


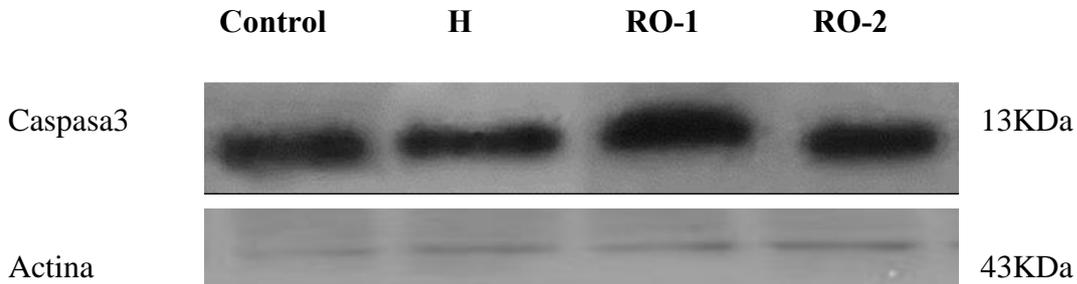
Figura 21: Detección de la proteína AIF. (A) Detección de la densidad óptica del fragmento de 60KDa respecto a la banda que corresponde a AIF. La β -actina se utilizó como control interno para la concentración de proteínas. (B) Resultados de proteína AIF en Western Blot analizados en Image J indican un aumento de la expresión de la proteína AIF en los grupos que pasaron por hipoxia, siendo el grupo RO-1 significativo. (C) Cortes cerebrales a nivel coronal evidenciando cambios celulares en la zona de CA3 del hipocampo. Se evidencian cambios en la conformación de célula en el grupo H y mayor expresión de síntesis de la proteína AIF en el grupo RO-1. . * $p < 0.05$. Barra de aumento 100 μ m.

Actividad de Caspasa3

La cascada apoptótica iniciada por la liberación de citocromo c y AIF al citosol puede activar la cascada de las caspasas, de la que la caspasa 3 es el principal ejecutor. La hipoxia induce un aumento de la actividad de la caspasa 3 que no alcanza a ser estadísticamente significativo según la valoración por western blot (Figura 22A y B) debido a la varianza, mientras que el análisis inmunohistoquímica demuestra diferencias en la expresión de la caspasa 3 en la corteza y en la neuronas de CA3 (Figura C). Después de 24 h y 48 h de re-oxigenación hay un aumento significativo de la

activada caspasa 3. Los resultados por inmunohistoquímica confirman el aumento de la caspasa 3 en la corteza e hipocampo (giro dentado y CA3).

(A)



(B)

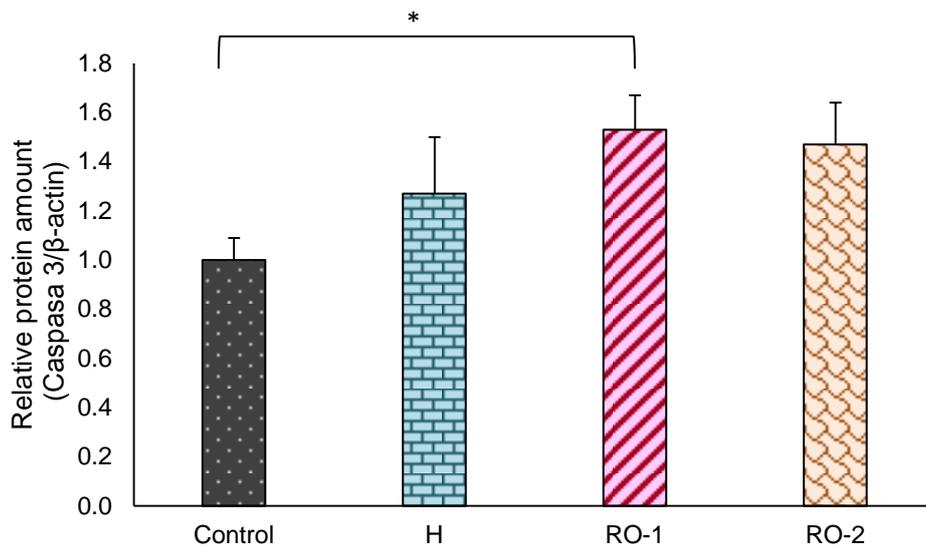


Figura 22: Detección de los niveles de caspasa 3 en el cerebro de ratas expuestas a la hipoxia y después de 24 h y 48 h de reoxigenación. (A) Western Blots representativos de la presencia de caspasa 3. β -actina indica la cantidad de muestra usada. (B) Análisis de la densidad óptica de las bandas usando el software Image J. Los cambios son expresados como cantidades relativas de proteína. Los valores están expresados estadísticamente por la media \pm DEM (n=6), siendo * $p \leq 0.05$.

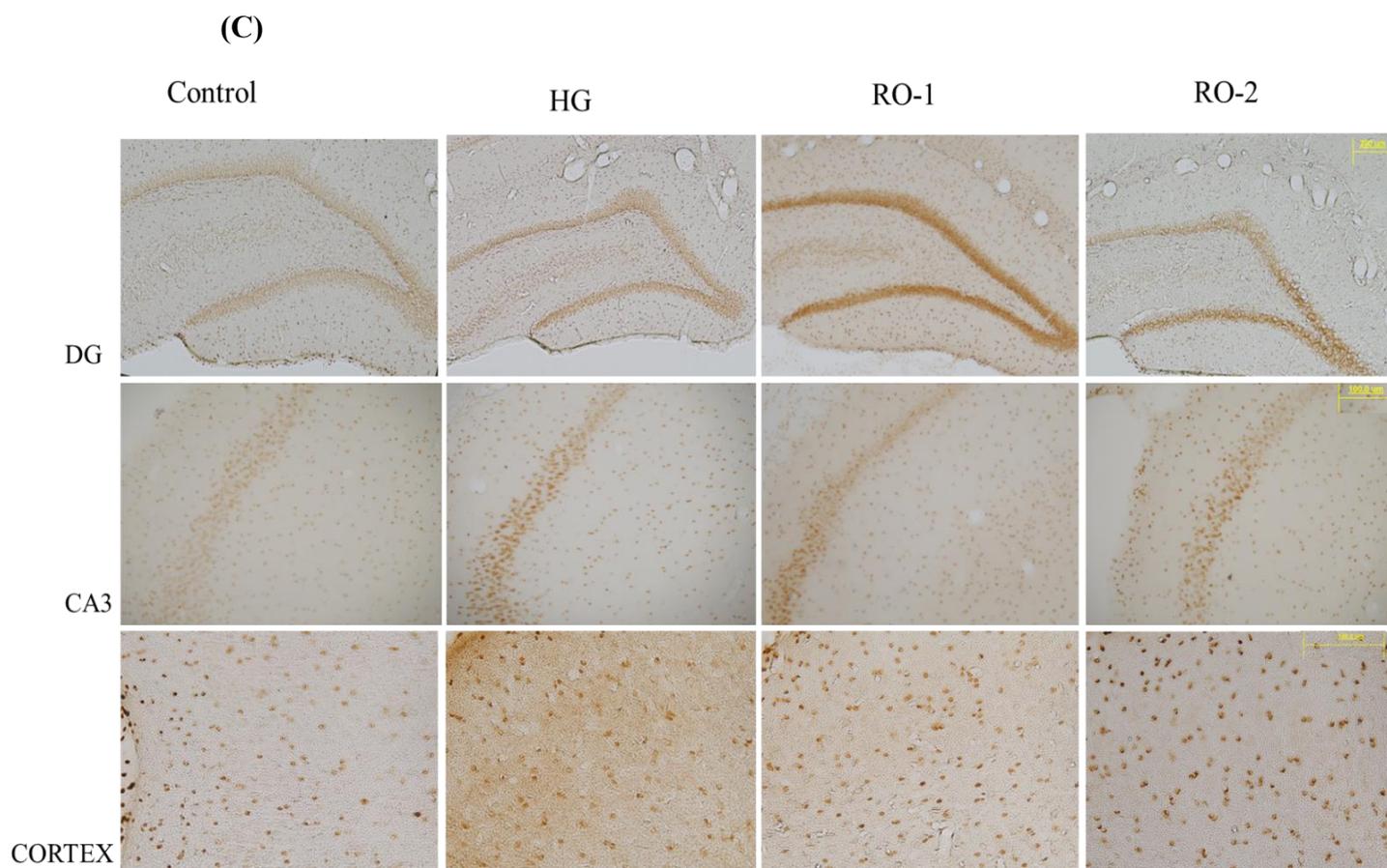


Figura 22 (C): En el panel de registros fotográficos encontramos cortes cerebrales a nivel coronal de las ratas y sus cambios celulares en la expresión de proteína en el hipocampo y Corteza. Los datos se presentan respecto a la media \pm SD y presentan cambios significativos en todos los grupos. $p \leq 0.05$. Barra de aumento 100 y 200 μ m.

4.1.5. Factores de Transcripción

La célula posee sistemas específicos que la defienden ante cambios controlados o abruptos del contenido de oxígeno y ante los ROS que se encuentran relacionados con dichos cambios. Dentro de estos sistemas se encuentran factores de transcripción como HIF-1 y NF-kB.

HIF-1 α

Ante una situación de hipoxia o alarma de la célula el factor inductor de hipoxia (HIF) se ve activado, principalmente el HIF-1 α , induciendo a una respuesta celular para evitar la apoptosis. Se sabe que el HIF actúa sobre genes codificadores como la eritropoyetina y VEGF. Los resultados de la expresión de HIF-1 en este experimento, muestran que una vez sometido a hipoxia severa el grupo H muestra un incremento

importante en comparación al grupo control (0.96 ± 0.07 y 2.06 ± 0.26 unidad relativa de proteína) respectivamente. Los grupos RO-1 y RO-2 también se ven aumentados en relación al grupo control, siendo significativo en RO-1, mostrando que la proteína HIF-1 α sigue activada (Figura 23).

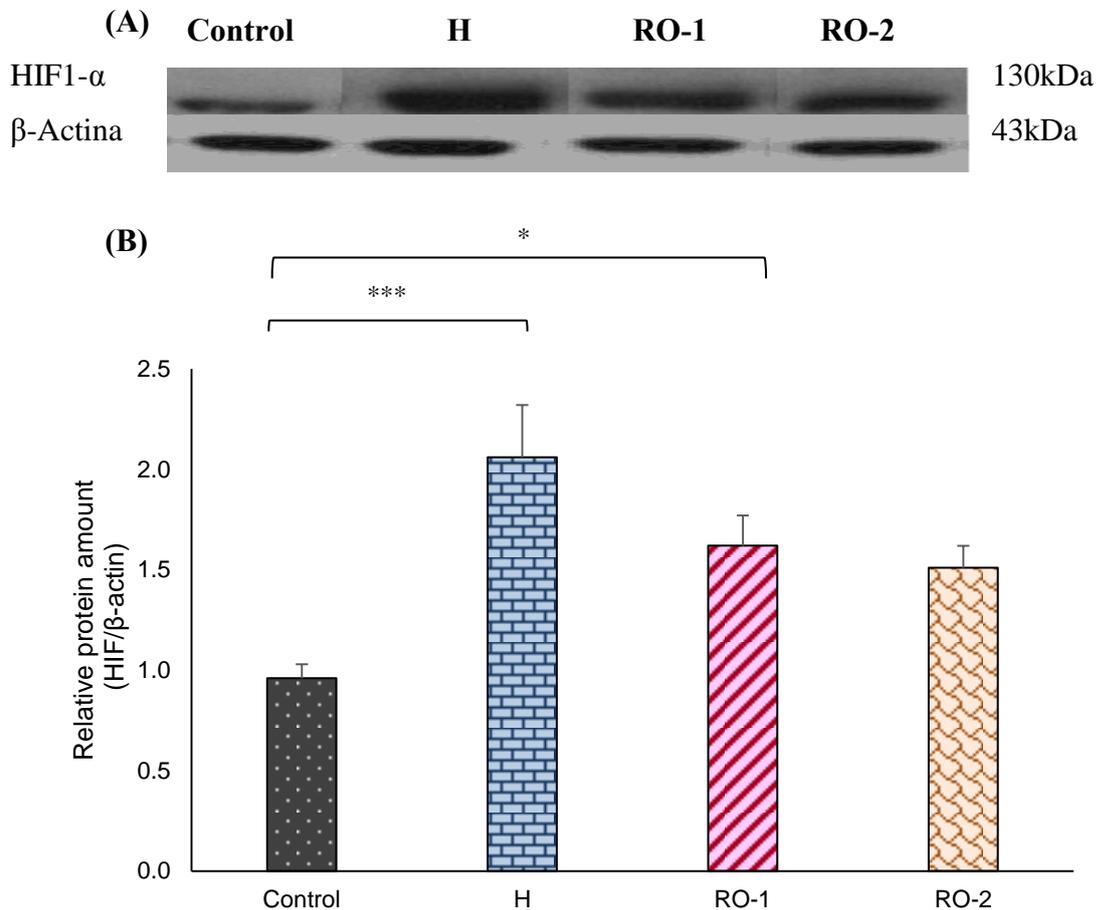


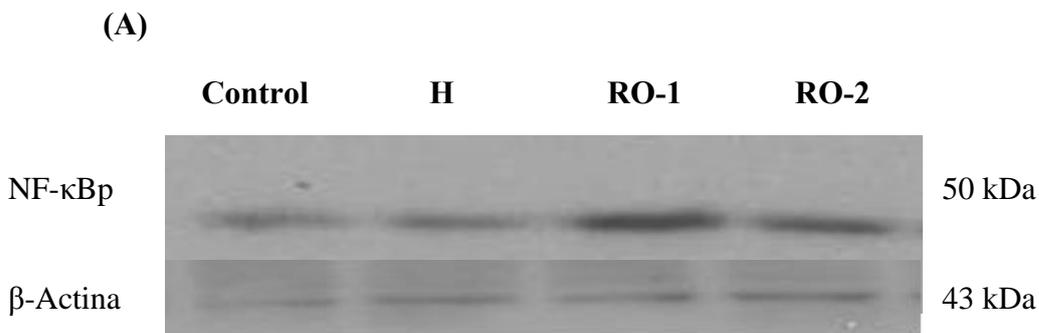
Figura 23: - Expresión de los niveles de HIF en el cerebro de ratas expuestas a hipoxia severa (H). (A) Western Blot para la detección de la expresión de la proteína HIF1- α , expresión relativa del fragmento de 130kDa respecto a la banda que corresponde a HIF1- α . (B) Representación gráfica de los grupo control, H, RO-1 y RO-2, en condiciones de normoxia existe un nivel basal de la proteína en las células cerebrales, pero una vez estas células experimentan un fenómeno hipóxico su expresión aumenta hasta niveles significativos desde las 0 horas posteriores al evento hipóxico (grupo H) hasta las 48 horas (RO-2). La β -actina se utilizó como control interno para la concentración de proteínas. Los valores están expresados estadísticamente por la media \pm DEM, siendo * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$.

NFκB

El Factor nuclear kappa B (NF-κB) es uno de los factores celulares transcripcionales vitales. Funciona como pieza clave en sistemas de respuesta rápida a señales extracelulares desde el exterior hacia el núcleo celular, controla y regula la expresión de distintos genes. NF-κB tiene importancia en la producción de óxido nítrico y en la interacción entre células.

En este trabajo estudiamos los resultados de NFκB encontrados en las técnicas aplicadas de western blot e inmunohistoquímica.

En la caracterización de NFκB se evidencia en las fotografías tomadas en cada uno de los grupos experimentales de inmunohistoquímica un aumento en la expresión en los grupos que fueron sometidos a hipoxia, los grupos H, RO-1 y RO-2. En el grupo H se observa un aumento en la expresión de la proteína NF-κB, pero en los grupos RO-1 y RO-2 la expresión se acentúa aún más. Cuando se compara la expresión de la proteína en los grupos RO-1 y RO-2 se puede observar un aumento de la expresión del NFκB en los núcleos del área de CA2 del hipocampo, mientras que en el grupo control los núcleos se observan vacíos, sin expresión de la proteína. Los resultados son compatibles con los obtenidos en las pruebas de Western Blot. Los datos estadísticos en cada uno de los grupos fueron significativos mostrando una tendencia con el tiempo de re-oxigenación (Figura 24 A, B yC).



(B)

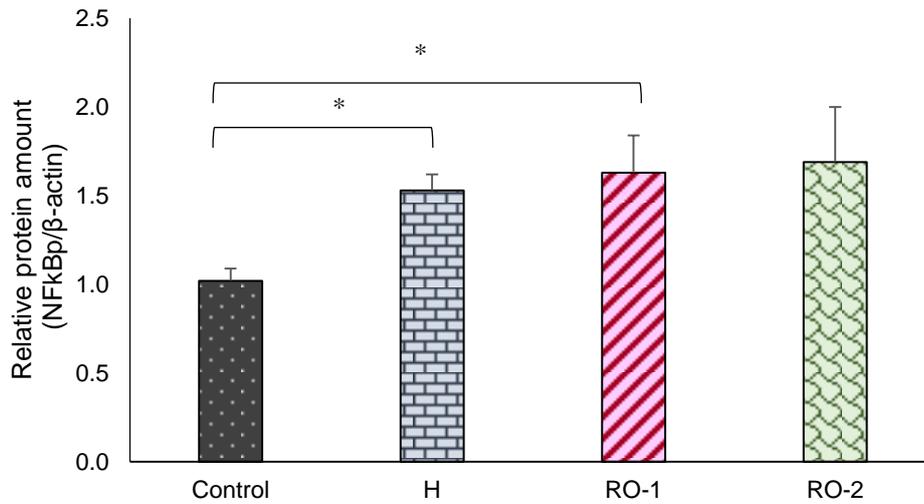


Figura 24: Caracterización de la expresión de NF-κB en los diferentes grupos experimentales Control, H, RO-1 y RO-2. (A y B) Representación gráfica de resultados obtenidos en la prueba de Western Blot analizados en Image J, la expresión relativa del fragmento de 50 kDa respecto a la banda que corresponde a NF-κBp. La β-actina se utilizó como control interno para la concentración de proteínas. Los valores están expresados estadísticamente por la media ± SEM, siendo * $p \leq 0,05$.

(C) NFκB

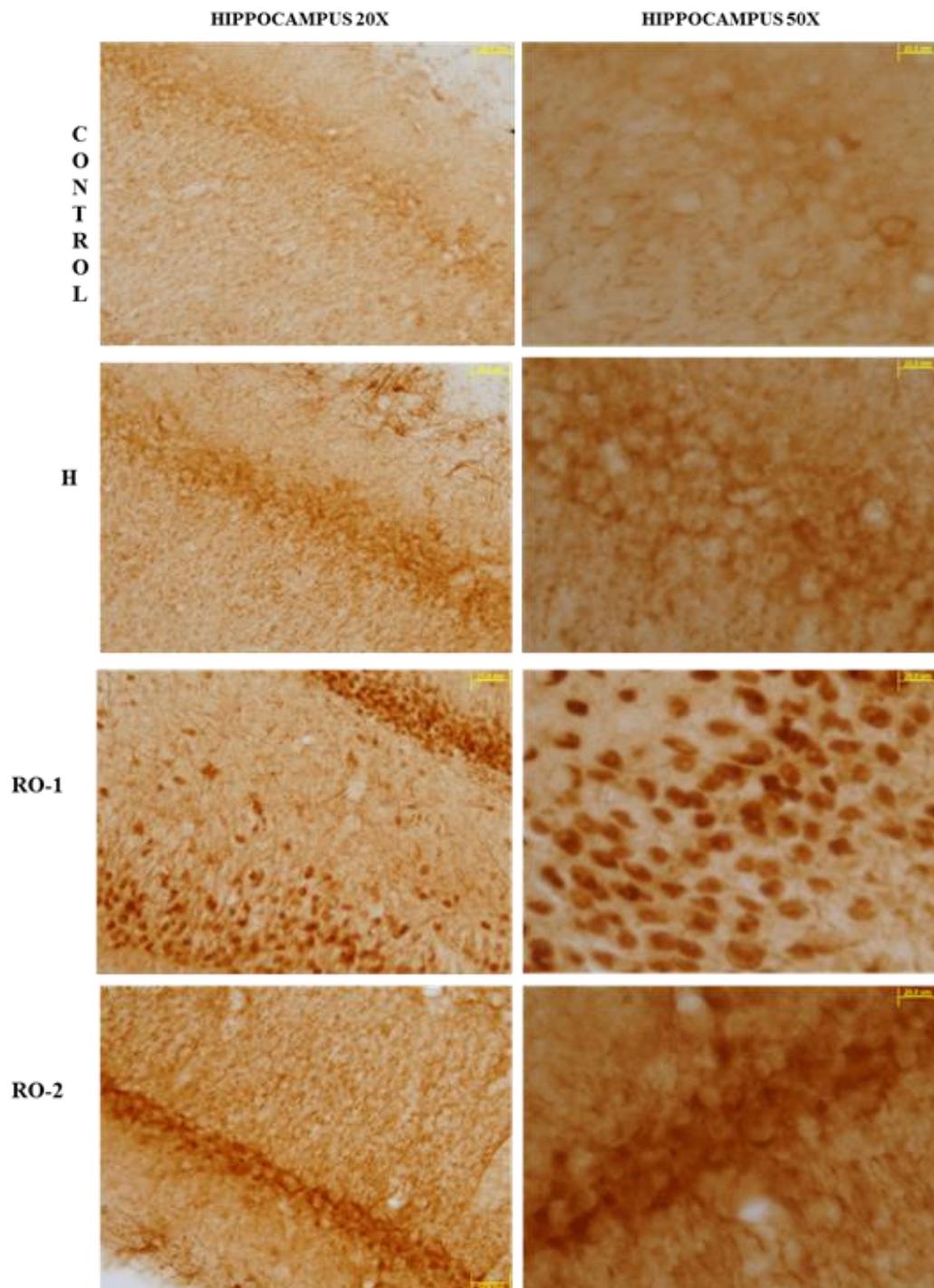


Figura 24 (C): Cortes cerebrales a nivel coronal evidenciando cambios celulares en el hipocampo en la zona de CA2, se puede observar un aumento de la expresión de la proteína en los grupos de Re-oxigenación, siendo más evidente en el grupo RO-1 y RO-2 esta expresión se observa tanto en el citosol como en el núcleo celular. Barra de aumento 20µm.

4.2 Experimento 2: Efecto de la hipoxia hipobárica intermitente antes de la exposición a hipoxia normobárica severa (7% FiO₂) de 6 horas de duración.

Neuroprotección.

Ha sido descrito que la exposición intermitente a hipoxia moderada aguda induce neuroprotección frente al estrés oxidativo inducido por ácido kainítico (Costa y col., 2013). Una vez caracterizado el efecto de la hipoxia respiratoria aguda severa sobre el estrés oxidativo y marcadores de la cascada apoptótica en el cerebro (experimento 1), estudiamos el efecto de la exposición a hipoxia respiratoria aguda severa antes y después de una exposición intermitente a hipoxia hipobárica moderada sobre el cerebro.

4.2.1 Efecto de la hipoxia sobre la peroxidación lipídica

La exposición a hipoxia respiratoria intermitente no induce cambios significativos en los niveles de MDA en el cerebro (grupo HHI), indicadores de peroxidación lipídica comparados con el grupo control. La exposición a hipoxia aguda severa induce un aumento significativo en los niveles de MDA cerebral (grupo HS). Este aumento aparece inhibido en los animales previamente expuestos a hipoxia intermitente (grupo HHI+HS). Los resultados muestran que la exposición a hipoxia intermitente protege de la peroxidación lipídica causada por la hipoxia severa aguda en el cerebro (Figura 25).

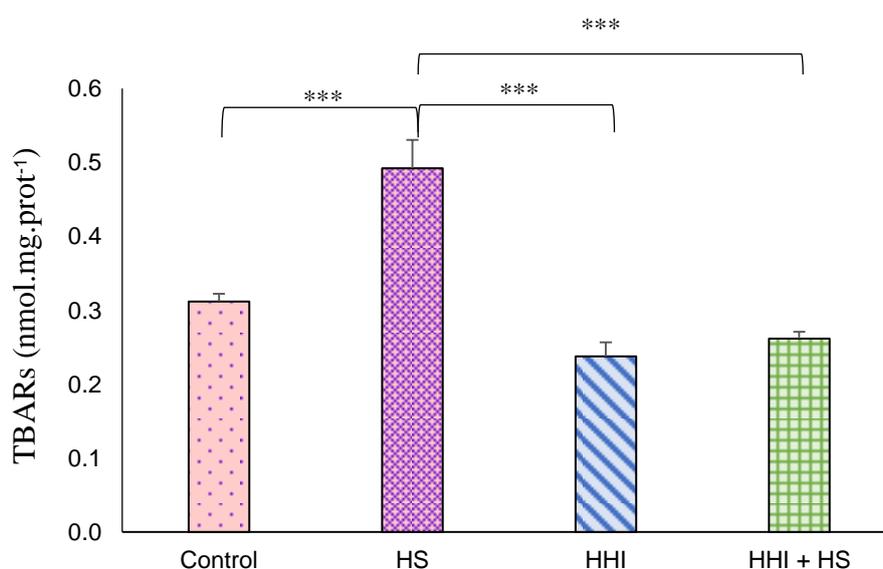


Figura 25: La hipoxia aguda severa (HS) aumenta la peroxidación lipídica en el cerebro. El aumento es inhibido por la exposición previa a hipoxia intermitente. Los niveles de ácido barbitúrico son medidos como ácido malonaldehído. Los resultados son expresados

como media \pm DEM (n=6). *** $p \leq 0.001$; ** $p \leq 0.01$; * $p \leq 0.05$, dos veces más alto que al grupo control, HHI y HHI+HS.

Detección de Proteínas Oxidadas: AOPP

La exposición a hipoxia respiratoria intermitente no cambia significativamente los niveles de AOPP en el cerebro (grupo HHI), indicadores de oxidación de proteínas, comparados con el grupo control. La exposición a hipoxia aguda severa induce un aumento significativo en los niveles de AOPP cerebral (grupo HS). Este aumento aparece inhibido en los animales previamente expuestos a hipoxia intermitente (grupo HHI+HS). Los resultados muestran que la exposición a hipoxia intermitente protege de la oxidación de las proteínas causada por la hipoxia severa aguda en el cerebro (Figura 26).

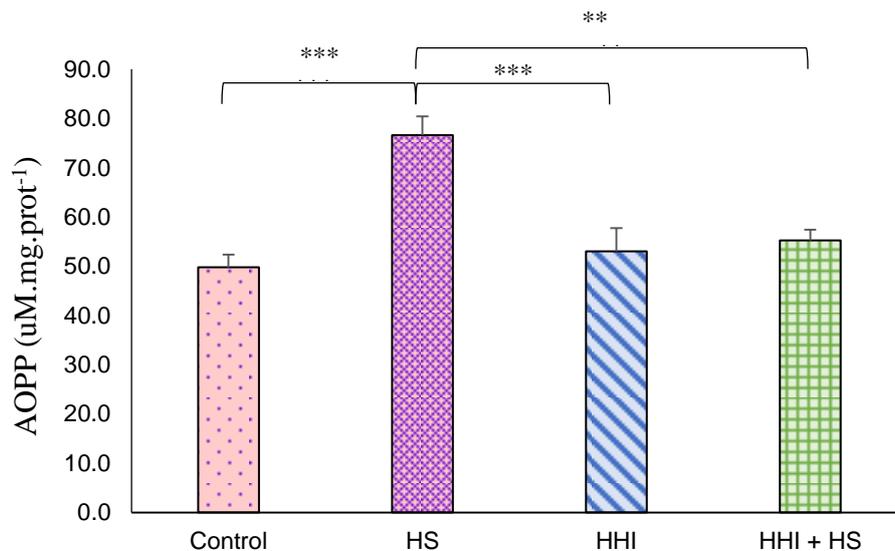


Figura 26: La hipoxia (HS) aumenta la oxidación de proteínas en homogenado de tejido cerebral. El aumento es inhibido por la exposición previa a hipoxia intermitente (HHI+HS). Los datos son expresados como media \pm DEM. (n=6). ** $p \leq 0.01$; *** $p < 0.001$.

4.2.2. Efecto de la hipoxia sobre la producción de óxido nítrico

La exposición a hipoxia aguda severa induce un aumento significativo en los niveles de NOx en el cerebral (grupo HS) comparados con los valores del grupo control. El aumento de los niveles de NOx inducido por la exposición a hipoxia severa aguda (HS) son inhibidos si las ratas han sido expuestas previamente a hipoxia intermitente (HS) son inhibidos si las ratas han sido expuestas previamente a hipoxia intermitente (HS) son inhibidos si las ratas han sido expuestas previamente a hipoxia intermitente (HHI+HS). La hipoxia intermitente (HHI) no induce cambios significativos sobre los niveles metabolitos indicadores de la generación de NO (NOx) en el cerebro comparados con el grupo control. Los resultados muestran que la exposición a hipoxia intermitente disminuye la formación de NO causada por la hipoxia severa aguda en el cerebro (Figura 27).

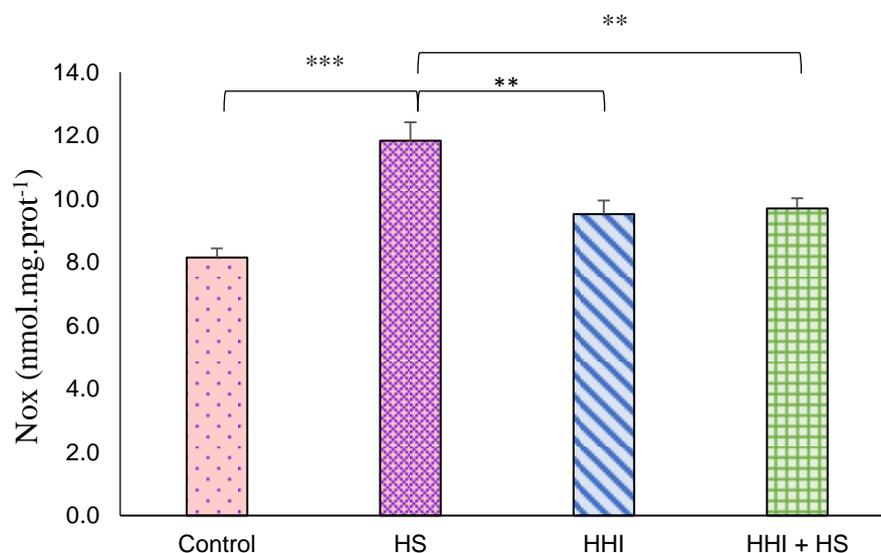


Figura 27: La hipoxia severa induce un aumento de los niveles de NOx en el cerebro del grupo HS. El aumento es inhibido por la exposición previa de los animales a hipoxia intermitente (HHI+HS). La exposición a hipoxia intermitente no tiene efecto significativo sobre los niveles de Nox cuando comparados con el grupo Control. Los datos son expresados como media \pm DEM (n = 6); ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$.

4.2.3. Actividad antioxidante en el cerebro de ratas expuestas a hipoxia

Actividad de SOD

La hipoxia causa una disminución significativa de la actividad de la SOD (1.58 ± 0.09 U/mg de proteína en el control vs. 1.10 ± 0.04 U/mg de proteína en el grupo HS) (Figura 28). No hay diferencias significativas en la actividad de SOD entre los grupos de hipoxia severa antes (HS) y después (HHI+HS) de la exposición intermitente a la hipoxia.

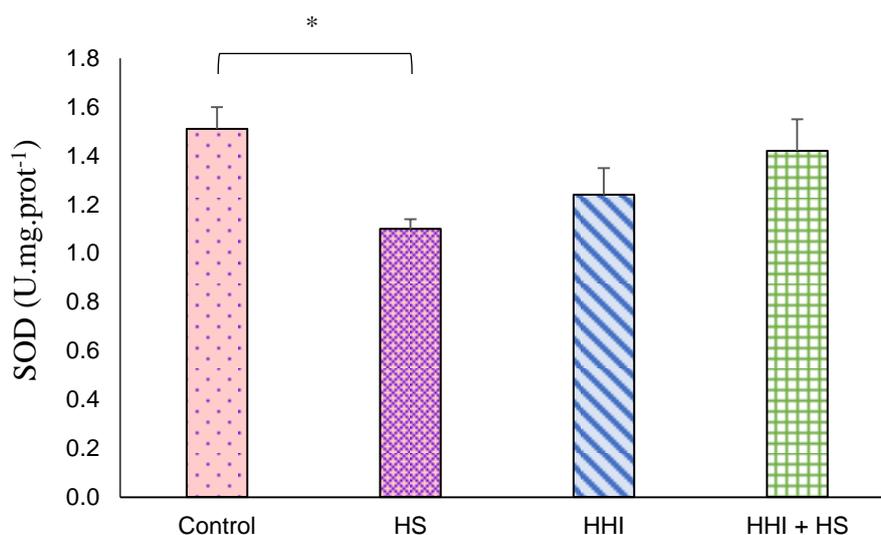


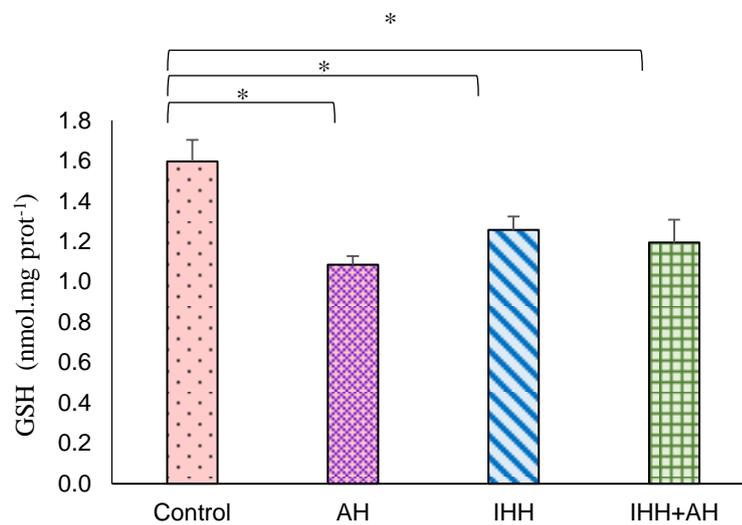
Figura 28: La hipoxia severa causa una disminución de la actividad SOD en el cerebro. La hipoxia intermitente no modifica significativamente la actividad SOD. Los datos son expresados como la media \pm DEM. (n=6). *p<0.05vs grupo control.

Sistema Glutación

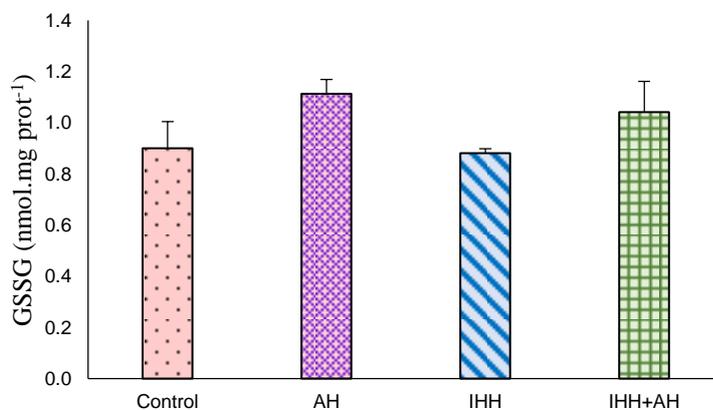
Los resultados, como muestra la figura 29, indican una disminución significativa en los niveles de GSH en las ratas expuestas a la hipoxia severa comparada con los valores del grupo control ($p < 0.01$). Sin embargo, en los animales expuestos a hipoxia intermitente (HHI) los niveles de GSH no difieren significativamente de los niveles en el grupo control. La exposición previa a hipoxia intermitente no induce una recuperación significativa de los niveles de GSH en las ratas expuestas a hipoxia intermitente más hipoxia severa (HHI+HS) comparados con el grupo de hipoxia severa (HS) (Figura 29A).

Los niveles de la forma de glutatión oxidada (GSSG) están aumentados significativamente ($p < 0.1$) en los cerebros de los animales expuestos a hipoxia severa (HS) comparados con el grupo control. No hay diferencia significativas en los niveles de GSSG en el cerebro entre los grupos expuesto a hipoxia: severa (HS), intermitente (HHI) e intermitente y severa (HHI+HS) (Figura 29B). La relación glutatión reducido/glutatión oxidado está significativamente disminuida en el cerebro de los animales expuestos a hipoxia severa (HS) comparados con el grupo control. La exposición a hipoxia intermitente no modifica esta relación inducida por la hipoxia severa (HHI+HS) (Figura 29C).

(A) GSH



(B) GSSG



GSH/GSSG

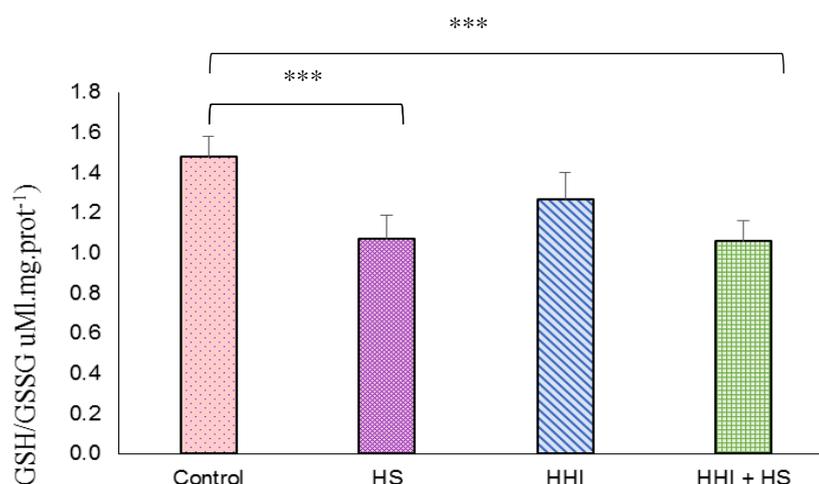


Figura 29: Efecto de la exposición a hipoxia severa y a hipoxia intermitente en el sistema glutatión en homogenado de cerebro. (A) La hipoxia severa (HS) causa una disminución en la actividad GSH que no es recuperada por la exposición a hipoxia intermitente. (B) La hipoxia severa induce un aumento de la actividad GSSG que no es modificada por la exposición a hipoxia intermitente. La exposición a hipoxia severa causa una disminución significativa en la relación GSH/GSSG comparada con el grupo control que no es modificada por la exposición a hipoxia intermitente. Los datos están expresados como la media \pm DEM (n=6). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$.

Sistema glutatión peroxidasa y glutatión reductasa

GPx

Los niveles de GPx en el cerebro de las ratas expuestas a hipoxia se observan alterados cuando comparados al grupo control. En el grupo HS la actividad de la GPx es de 13 ± 0.49 U/mg de proteína mientras que en el grupo control los valores son de 15.4 ± 0.93 U/mg de proteína. La exposición intermitente a la hipoxia (HHI) induce una disminución aún más brusca (8.2967 ± 0.92 U/mg de proteína y de 10.35 ± 0.62 U/mg de proteína en el grupo HHI+HS) cuando comparada al grupo control. Los niveles de GPx en el cerebro eran significativamente diferentes entre el grupo expuesto a la hipoxia severa (HS) y el grupo expuesto a hipoxia intermitente más hipoxia severa (HHI+HS) (Figura 30). La exposición intermitente a la hipoxia modifica el efecto de la hipoxia severa sobre los niveles de GPx en el cerebro.

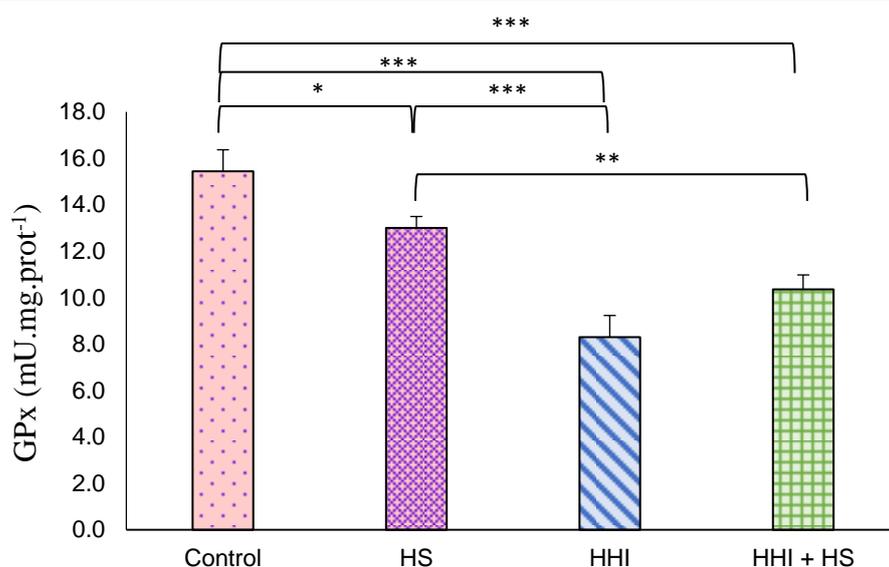


Figura 30: Efecto de la hipoxia sobre la actividad GPx en el homogenado de cerebro de ratas. La hipoxia severa tiene efecto sobre la GPx disminuyendo su actividad. La exposición intermitente a la hipoxia disminuye significativamente la actividad de la enzima GPx. La disminución de la actividad GPx se mantiene en el cerebro de las ratas expuestas a hipoxia intermitente seguida de la exposición a hipoxia severa. Los datos son expresados como la media \pm DEM (n = 6); * p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001.

GR

Los resultados muestran una disminución significativa ($p < 0,01$) de la actividad GR en el cerebro de las ratas expuestas a hipoxia severa (HS) comparadas con el grupo de normoxia (4.39 ± 0.19 U/mg de proteína vs 6.12 ± 0.24 U/mg de proteína, respectivamente). Sin embargo la exposición intermitente a la hipoxia (grupo HHI) induce una recuperación significativa en los niveles de GR comparados con los de las ratas expuestas a hipoxia severa (HS). La actividad GR de las ratas expuestas a hipoxia severa después de la exposición a hipoxia intermitente no difiere significativamente de los niveles de GR del grupo control, pero sí del grupo HS (4.39 ± 0.19 U/mg de proteína vs 6 ± 0.49 U/mg de proteína en el grupo HHI+HS) La exposición a hipoxia intermitente protege del efecto que la exposición a hipoxia severa causa sobre la actividad GR en el cerebro. (Figura 31).

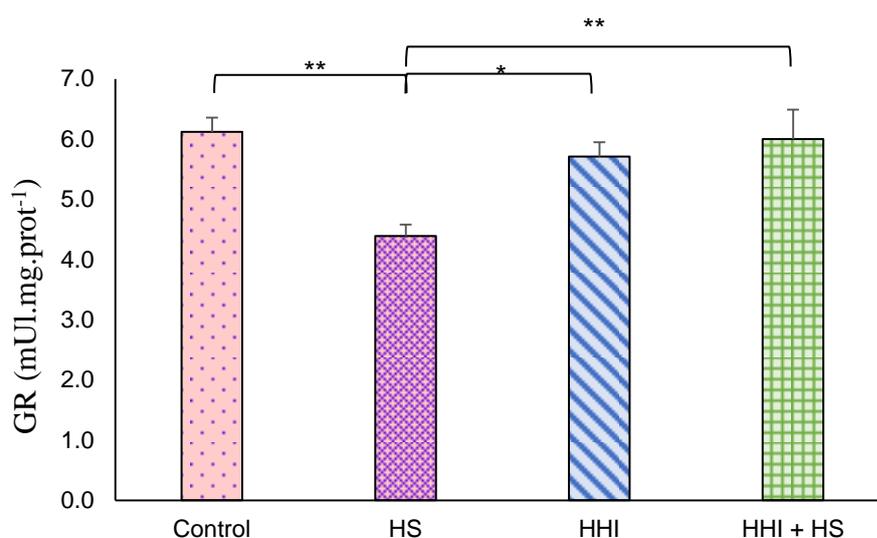


Figura 31: Efecto de la hipoxia sobre la actividad GR en el homogenado de cerebro de ratas. La hipoxia severa causa una disminución de la actividad GR. La exposición intermitente a la hipoxia lleva a recuperación significativa de la actividad de GR. La recuperación de la actividad GR inducida por la hipoxia intermitente se mantiene en el cerebro de las ratas expuestas a hipoxia intermitente seguida de la exposición a hipoxia severa. Los datos son expresados como la media \pm DEM (n=6); *p<0.05 y **p<0.01.

4.2.4. Factores de Transcripción

Regulación de la expresión de la proteína de HIF-1 α

La expresión de HIF-1 α en el homogenado de cerebro de las ratas era realizada por “*immunoblotting*”. Los resultados muestran un aumento significativo (p<0.01) de la expresión de HIF-1 α en el cerebro de los animales expuestos la hipoxia severa (HS) comparados con el grupo de normoxia (2.21 ± 0.26 vs 0.89 ± 0.08 unidades relativas de proteína en el grupo HS y control, respectivamente) También, que hay un aumento significativo (p<0.5) de la expresión de HIF-1 α en el cerebro de los animales expuestos a hipoxia intermitente (HHI) comparados con el grupo de normoxia, que aumenta (p<0.01) después de la exposición a hipoxia severa (HHI+HS) (2.11 ± 0.03 vs 0.89 ± 0.08 unidades relativas de proteína en el grupo HHI+HS vs grupo control).(Figura 32).

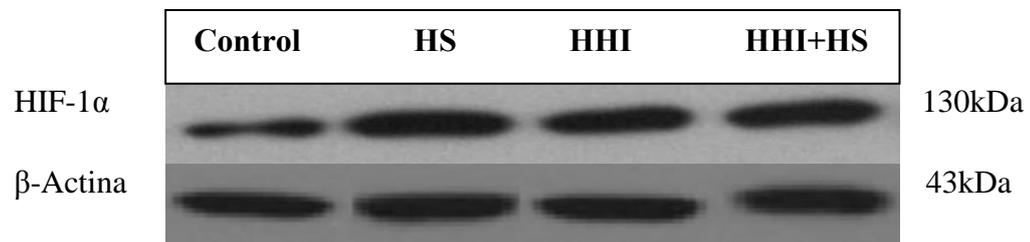
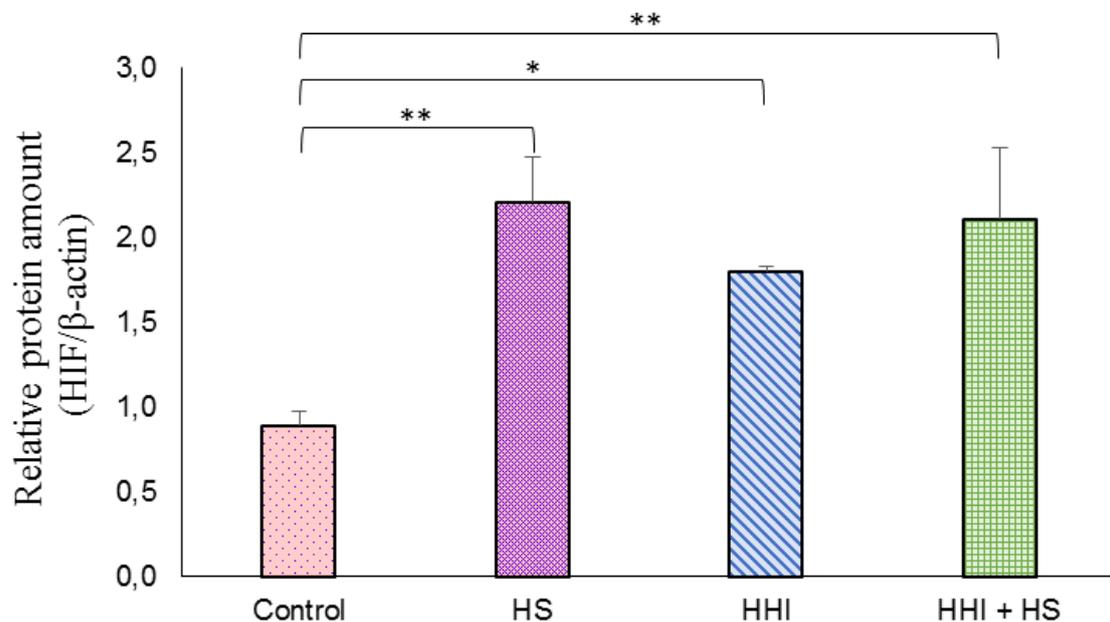
HIF-1 α **(A)****(B)**

Figura 32: Análisis por Western blot de la expresión de la proteína HIF1- α en el homogenado de cerebro de ratas expuestas a diferentes condiciones de hipoxia. (A) Blots representativos de la expresión de la proteína HIF1- α . La β -actina se utilizó como control interno para la concentración de proteínas. (B) Análisis de la densidad óptica de las bandas usando el software Image J. Los resultados son expresados como cantidades relativas de proteína. La hipoxia induce un aumento significativo de la expresión de HIF1- α . Los datos se expresan como la media \pm DEM; (n=6). *: $p \leq 0.01$; **: $p \leq 0.001$.

Regulación de la expresión de NFκβ

La expresión de NFκβ en el homogenado de cerebro de las ratas fue realizada por “*immunoblotting*”. Los resultados muestran un aumento significativo ($p < 0.01$) de la expresión de NFκβ en el cerebro de los animales expuestos a la hipoxia severa (HS) comparados con el grupo de normoxia. Los resultados también muestran que la expresión de NFκβ en el cerebro de ratas después de la exposición intermitente a hipoxia moderada no cambia significativamente comparada con la expresión observada en los cerebros de las ratas del grupo control (normoxia) (Figura 33). El aumento significativo de la expresión de NFκβ inducido por la hipoxia severa era inhibido por la exposición previa de las ratas a hipoxia intermitente.

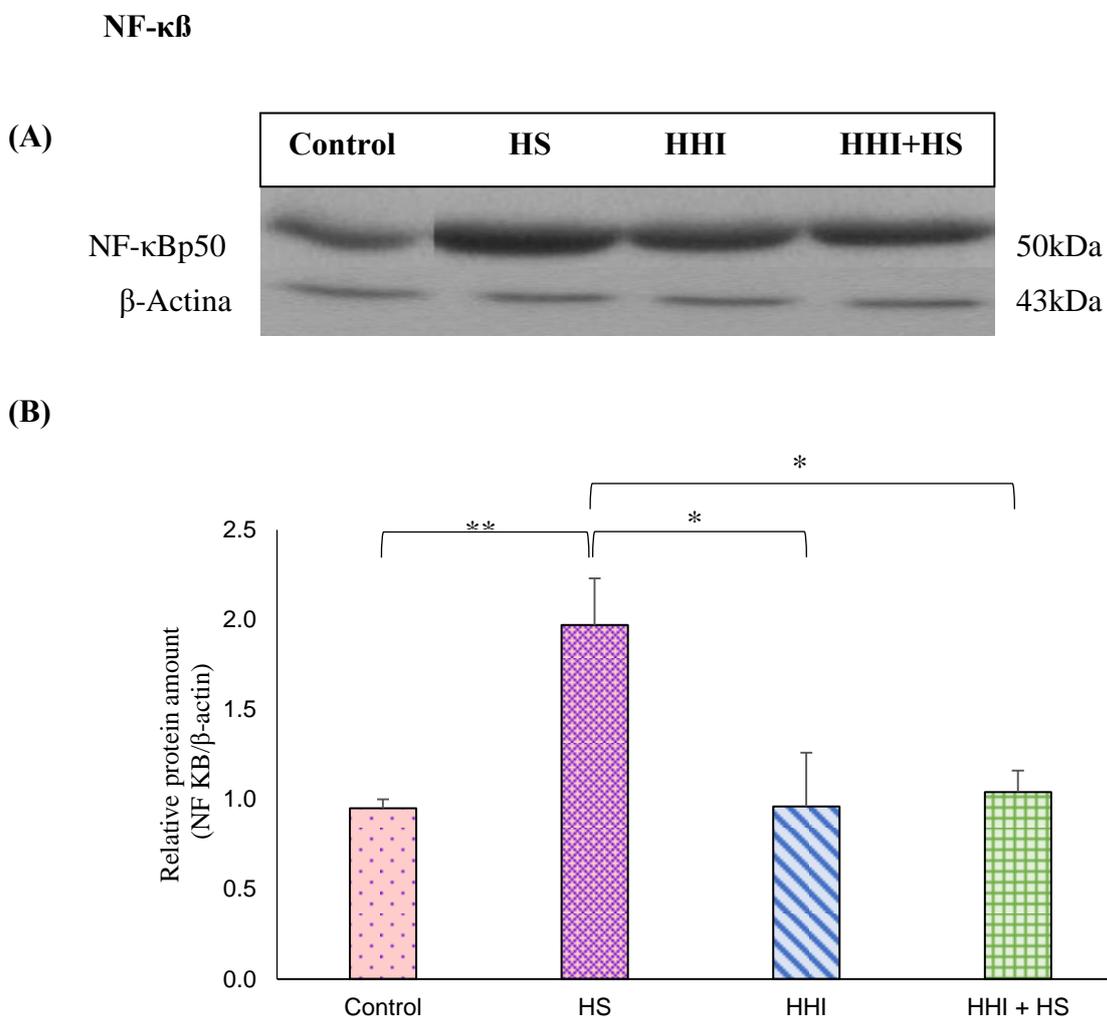


Figura 33: Caracterización de la expresión de la proteína NFκβ en las ratas de los diferentes grupos experimentales. (A y B) Representación gráfica de resultados obtenidos en la prueba de Western Blot analizados en Image J, la expresión relativa del fragmento de 50kDa

respecto a la banda que corresponde a NFκβ. La β-actina se utilizó como control interno para la concentración de proteínas. Datos expresados respecto a la media ± DEM siendo *p<0.05. **p≤ 0.01.

El hipocampo es una de las estructuras del cerebro más sensibles a la hipoxia. Análisis inmunohistoquímicos muestran la inducción de la expresión de NFκβ en el giro dentado (GD) y en capa CA3 del hipocampo de ratas expuestas a hipoxia severa (HS). Sin embargo, después de la exposición intermitente a hipoxia moderada, la exposición a hipoxia severa (HHI+HS) no induce aumento de la expresión NFκβ en el giro dentado y en la capa CA3 del hipocampo comparadas con el grupo control (normoxia).

(C)

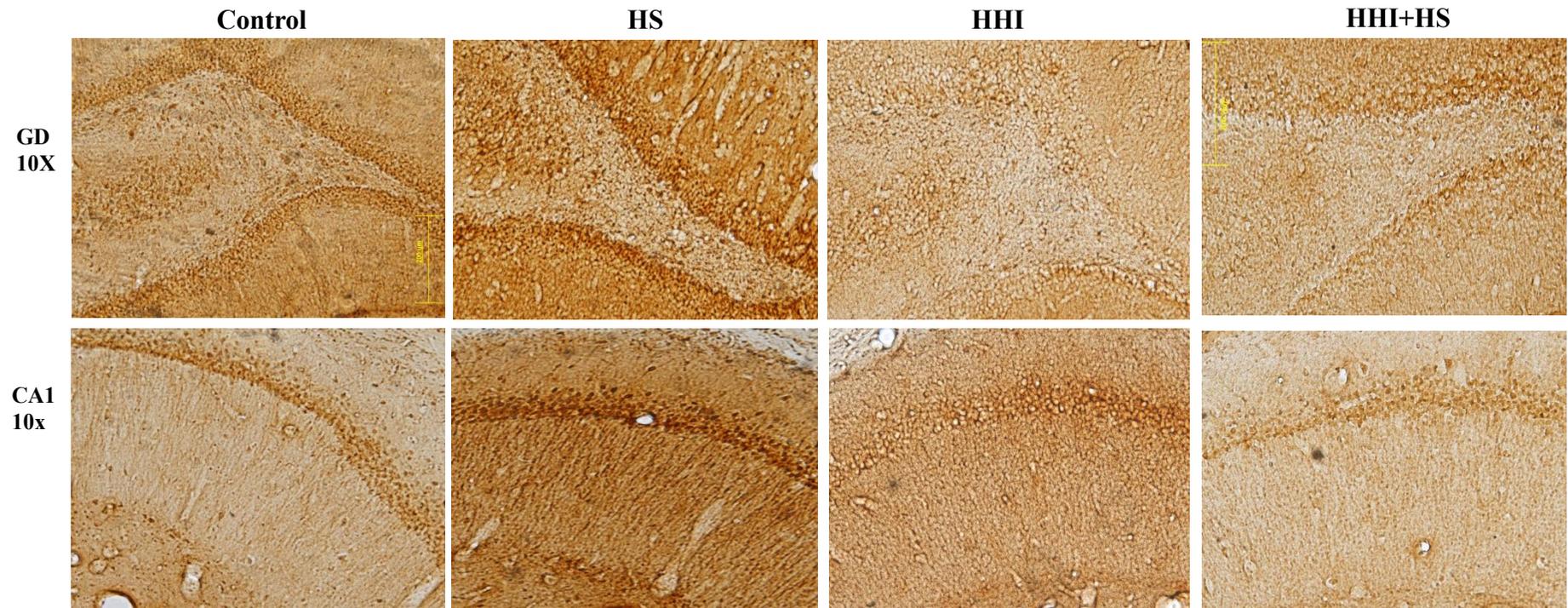


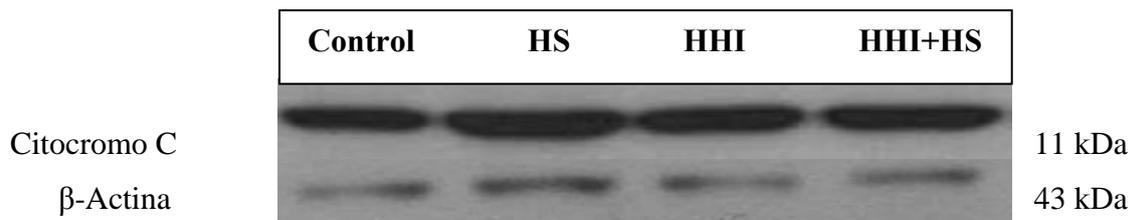
Figura 33 (C): Expresión de $\text{NF}\kappa\beta$ en cortes coronales de cerebro de rata cambios celulares En la capa CA2 del hipocampo se puede observar un aumento de la expresión de la proteína en el grupo HS. Esta expresión se observa tanto en el citosol como en el núcleo celular. Ya en los grupos que pasaron hipoxia intermitente la expresión de $\text{NF}\kappa\beta$ si observa muy floja, similar al grupo Control. Barra de aumento $200\mu\text{m}$.

4.2.5. Expresión de Proteínas Inductoras de Apoptosis

La expresión de proteínas inductoras de apoptosis fue analizada por Western blot e inmunohistoquímica. Los resultados muestran un aumento significativo ($p < 0.01$) de los niveles citosólicos del citocromo *c* en el homogenado del cerebro de ratas expuestas a hipoxia severa (HS) comparadas con los niveles en el homogenado del cerebro del grupo control. Sin embargo, los niveles de citocromo *c* en los grupos HHI y HHI+HS son significativamente ($p < 0.01$) menores que los niveles de citocromo *c* del grupo expuesto a hipoxia severa. No hay diferencias significativas en los niveles de citocromo *c* de los grupos HHI y HHI+HS comparados con los niveles de citocromo *c* del grupo control (figura 34).

Citocromo C

(A)



(B)

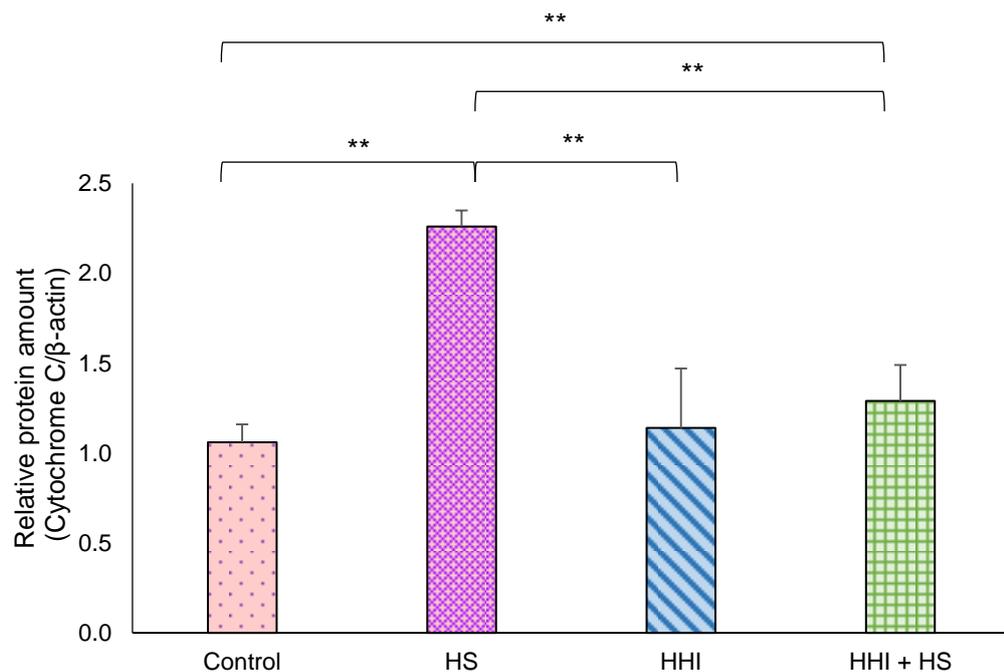


Figura 34: Expresión de los niveles de citocromo *c* en el cerebro de ratas. (A) Western Blots representativos de la presencia de citocromo *c*. β -actina se utilizó como control interno de la cantidad de muestra de proteínas. (B) Análisis de la densidad óptica de las bandas usando el software Image J. Los cambios son expresados como cantidades relativas de proteína. Los datos están expresados como media \pm DEM, (n=6). * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$.

AIF

Los resultados muestran un aumento significativo ($p < 0.05$) de los niveles de AIF en el homogenado de tejido cerebral en el grupo expuesto a hipoxia severa (HS) comparado con los niveles observados en el homogenado del tejido cerebral de las ratas del grupo control. (Figura 35). No hay diferencias significativas en los niveles de AIF entre los grupos expuestos a los diferentes tipos de hipoxia (HS, HHI y HHI+HS).

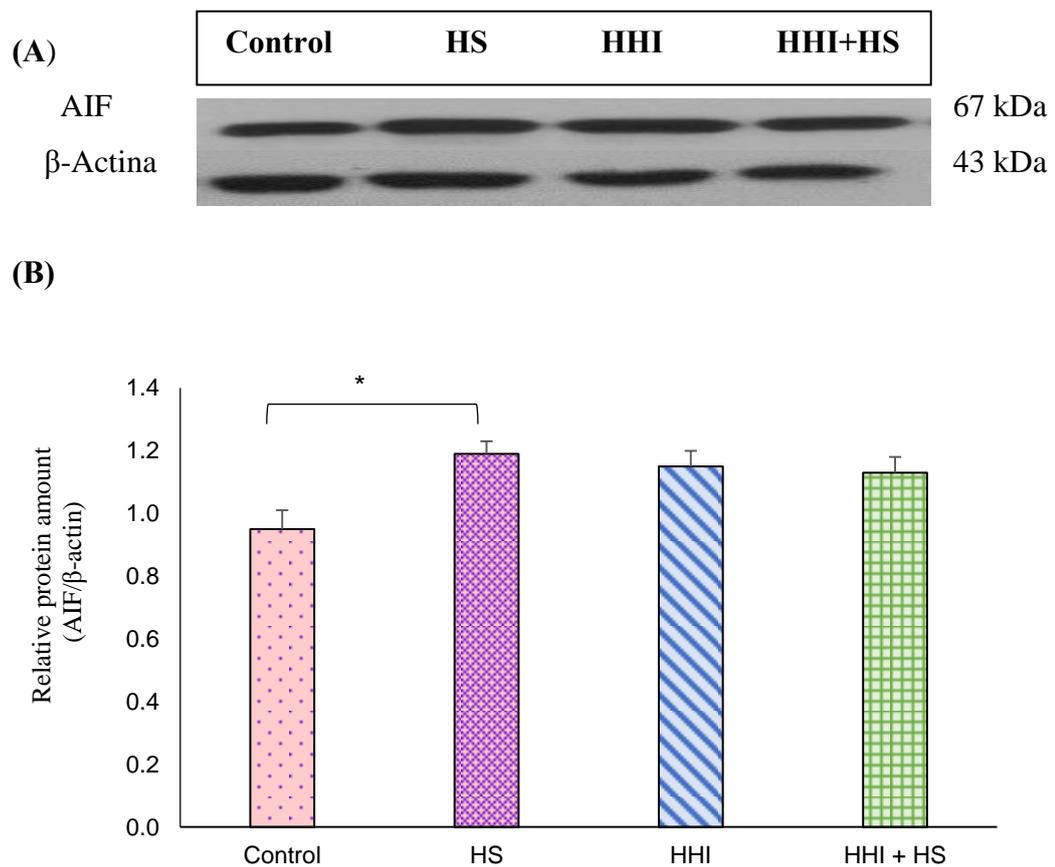


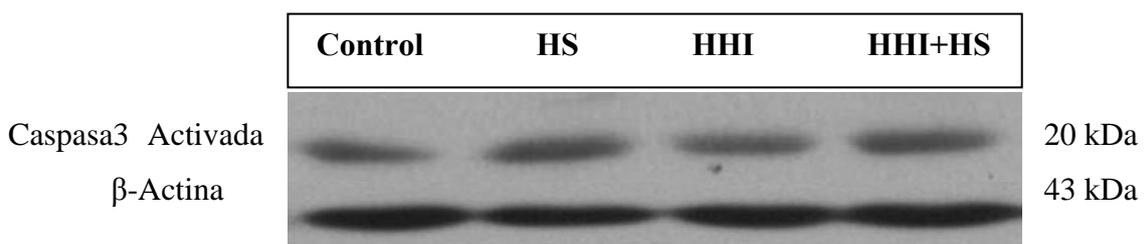
Figura 35: Expresión de los niveles de AIF en el cerebro de ratas. (A) Western Blots representativos de la presencia de AIF. β -actina se utilizó como control interno de la cantidad de muestra de proteínas cargada. (B) Análisis de la densidad óptica de las bandas usando el

software Image J. Los cambios son expresados como cantidades relativas de proteína. Los datos están expresados como media \pm DEM, (n=6). * $p \leq 0.05$.

Actividad de Caspasa3

La actividad de la Caspasa 3 ha sido analizada por western blot (Figura 36. A y B) en muestras de homogenado de cerebro y por inmunohistoquímica en cortes cerebrales (Fig. C). Los resultados muestran que la exposición a hipoxia severa (HS) causa un aumento significativo ($p < 0.001$) de la actividad de la caspasa 3 en el cerebro de las ratas comparada con la actividad observada en el cerebro del grupo control. Sin embargo la exposición a la hipoxia intermitente no causa cambios significativos de la actividad de la caspasa 3 en el cerebro de las ratas comparados con la actividad del grupo control. El aumento de la actividad de la caspasa 3 causado por la exposición a la hipoxia (grupo HS) es inhibido cuando antes las ratas son expuestas a hipoxia intermitente (HHI+HS). En el panel de registros fotográficos encontramos cortes cerebrales a nivel coronal de las ratas y sus cambios celulares en la expresión de proteína principalmente en las zonas del hipocampo y Corteza (Figura 36C). La síntesis de la proteína se nota más acentuada en los núcleos del giro dentado (GD) y de las células de la corteza del grupo HS. En el grupo HHI+HS se observa una disminución de la expresión de la proteína cuando comparada al grupo HS.

(A)



(B)

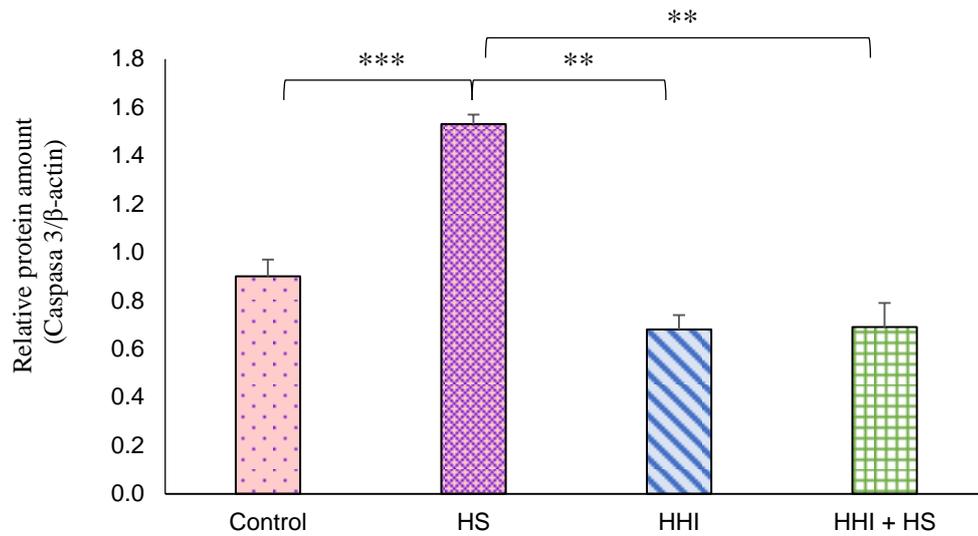


Figura 36: Detección de la actividad de caspasa 3 en el cerebro de ratas. (A) Western Blots representativos de la presencia de caspasa 3. β -actina indica la cantidad de muestra usada. (B) Análisis de la densidad óptica de las bandas usando el software Image J. La exposición a hipoxia severa (HS) causa un aumento significativo de la actividad de la caspasa 3 comparada con el grupo control, mientras que la actividad de la caspasa 3 después de la exposición intermitente a la hipoxia (HHI) y a hipoxia intermitente seguida de hipoxia severa (HHI+HS) difieren significativamente de la actividad del grupo expuesto a hipoxia severa (HS). Los resultados son expresados como cantidades relativas de proteína. Los datos se presentan como media \pm DEM; (n=6). ** $p < 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

(C)

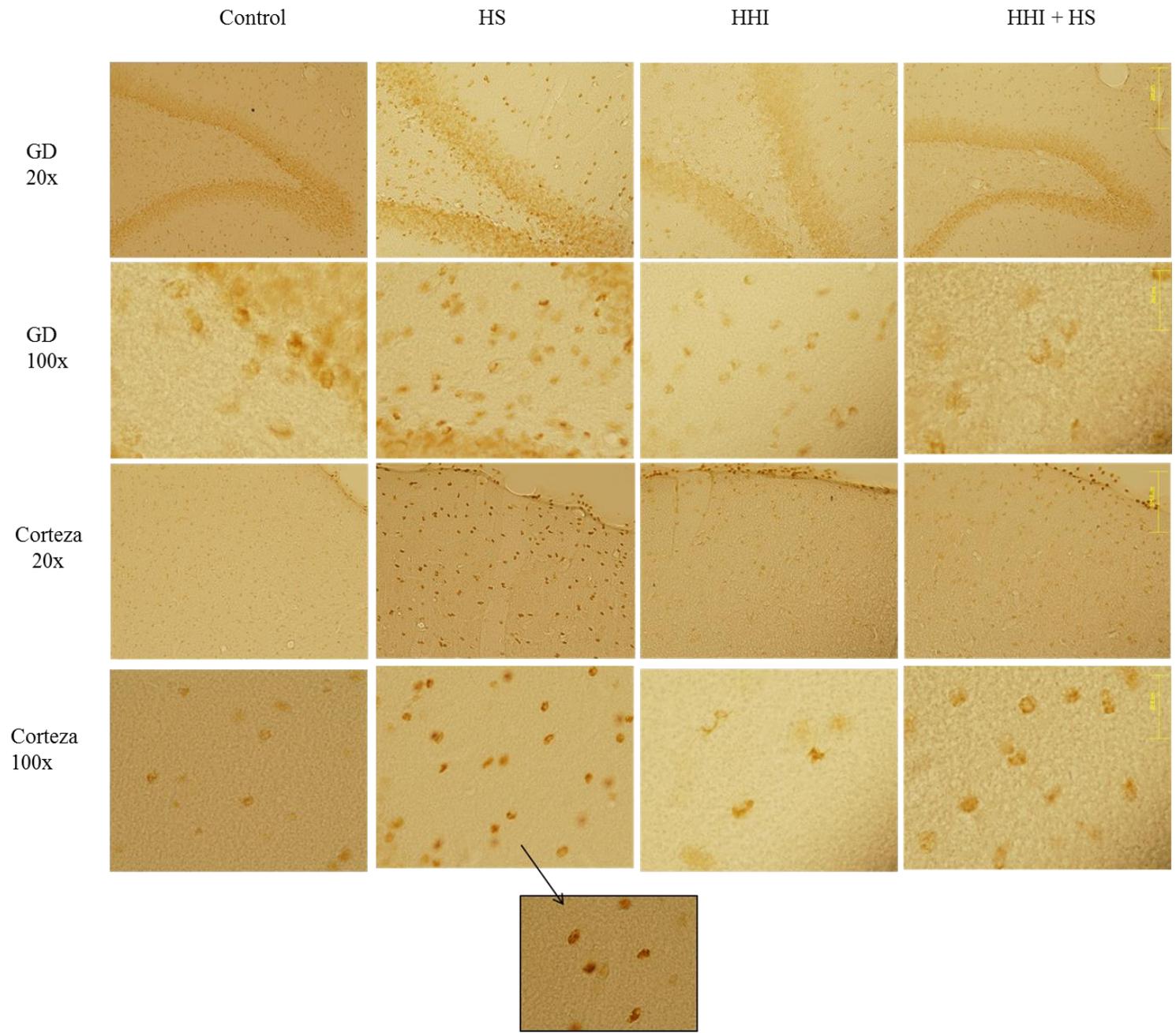


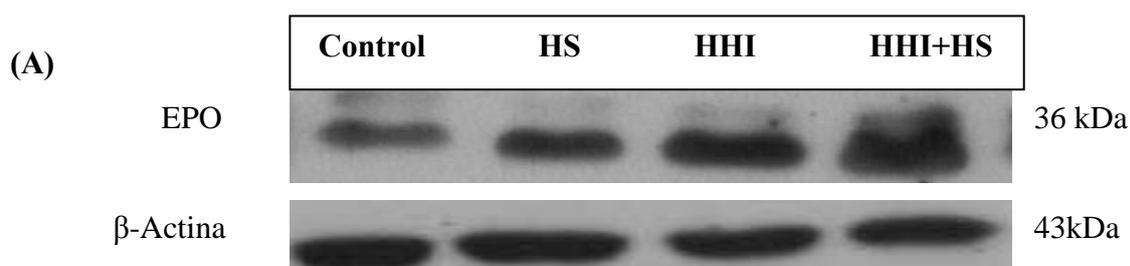
Figura 36 (C): Efecto del pre condicionamiento hipóxico sobre la muerte celular inducida por la hipoxia, detectado por inmunohistoquímica para Caspasa3. En el panel de registros fotográficos encontramos cortes cerebrales a nivel coronal de las ratas y sus cambios celulares en la síntesis de la proteína Caspasa3 en el GD del hipocampo y corteza. En el grupo HS cuando comparada con los grupos control y HHI y HHI+HS se observa un aumento de la expresión de la proteína caspasa3 en neuronas. En los grupos condicionados con cámara hipobárica no se observa un cambio significativo en la expresión de la proteína. Barra de aumento 100, 50 y 20µm.

4.2.6. Expresión de Proteínas Involucradas en la Angiogénesis y Neuroprotección

Entre los genes inducidos por el HIF-1 en respuesta a la hipoxia por su efecto neuroprotector analizamos la expresión en el homogenado de cerebro de la expresión de eritropoyetina y del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) descritos como potenciadores de la actividad antioxidante (EPO) y en estimular la angiogénesis y la producción de endotelina y otros mediadores vasoactivos.

Los resultados muestran que la exposición a hipoxia severa (HS) induce un aumento de la expresión de la EPO en el cerebro que no es significativo comparado con el grupo control. Sin embargo la exposición intermitente a la hipoxia (HHI) induce un aumento significativo ($p < 0.01$) de la expresión de EPO comparado con grupo control. (Figura 37). La posterior exposición a hipoxia severa (HHI+HS) lleva a un aumento mayor de la expresión de EPO ($p < 0.001$) con relación al grupo control (normoxia). Señalar el aumento significativo de la expresión de EPO en los grupos expuestos a hipoxia intermitente (HHI) y (HHI+HS) con relación al grupo de hipoxia severa (HS) no expuesto a hipoxia intermitente.

EPO



(B)

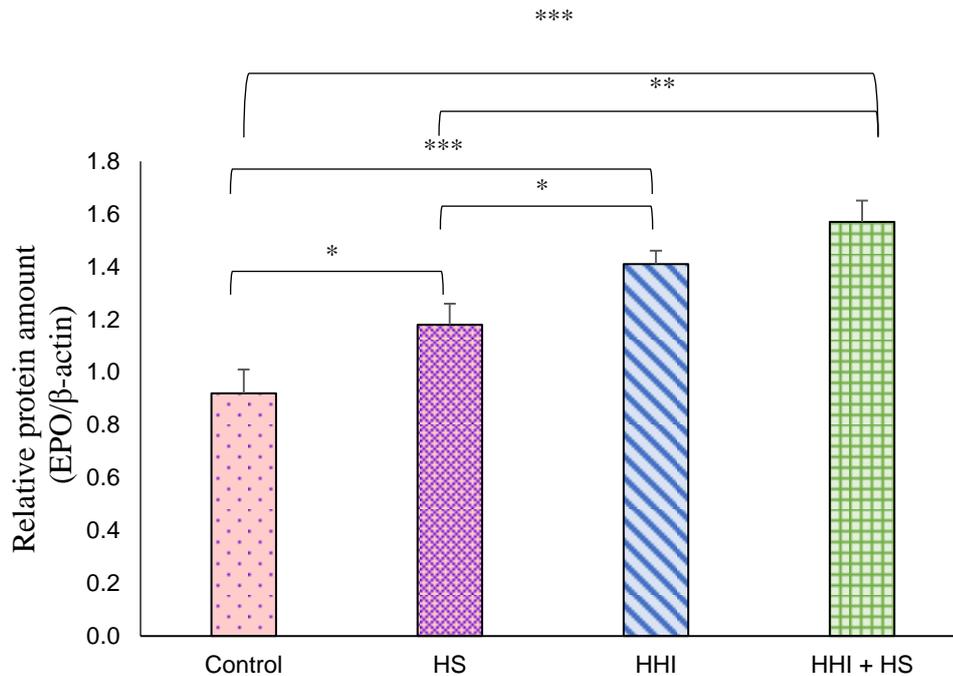
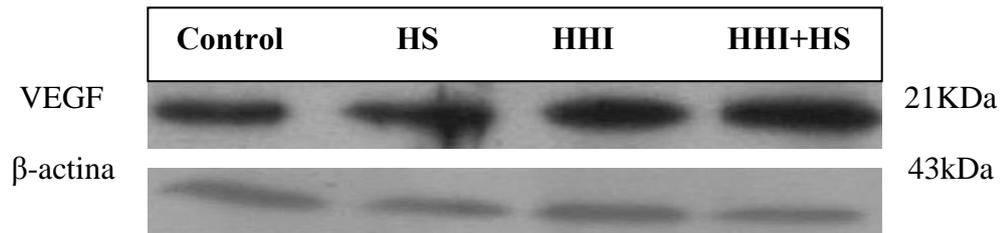


Figura 37: Detección de la expresión de EPO en el cerebro de ratas. (A) Western Blots representativos de la presencia de EPO. β -actina indica la cantidad de muestra usada. (B) Análisis de la densidad óptica de las bandas usando el software Image J. La exposición a hipoxia severa (HS) no lleva a aumento significativo de la expresión de EPO comparada con el grupo control, mientras que la expresión de EPO después de la exposición intermitente a la hipoxia (HHI) y a hipoxia intermitente seguida de hipoxia severa (HHI+HS) aumenta significativamente con relación al grupo control y al grupo expuesto a hipoxia severa (HS). Los resultados son expresados como cantidades relativas de proteína. Los datos se presenta como media \pm DEM; (n=6). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

VEGF

La exposición a hipoxia severa (HS) no induce cambios significativos en la expresión de VEGF en el cerebro comparado con el grupo control mientras que la exposición a hipoxia intermitente induce un aumento significativo ($p < 0.01$) de los niveles de VEGF. El aumento es mayor ($p < 0.001$) en el grupo expuesto a hipoxia intermitente seguida de exposición a hipoxia severa (HHI+HS). La exposición previa a hipoxia intermitente potencia la inducción de VEGF por la hipoxia severa. (Figura 38).

(A)



(B)

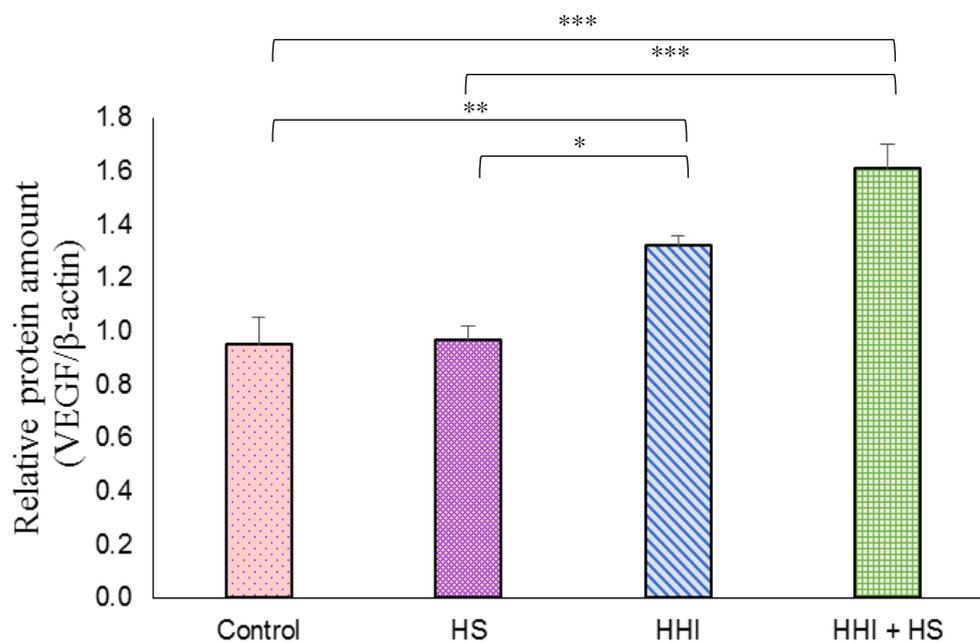


Figura 38. Caracterización de la expresión de VEGF en las ratas de los diferentes grupos experimentales (A y B). En la parte superior una representación gráfica de resultados de la prueba de Western Blot analizados en Image J, la expresión relativa del fragmento de 21 kDa respecto a la banda que corresponde a VEGF. Los resultados muestran que el grupo HHI +HS aumentó significativamente en relación a todos los otros grupos (control, HHI y HS). La β -actina se utilizó como control interno para la concentración de proteínas. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ y *** $p \leq 0.001$.

(C)

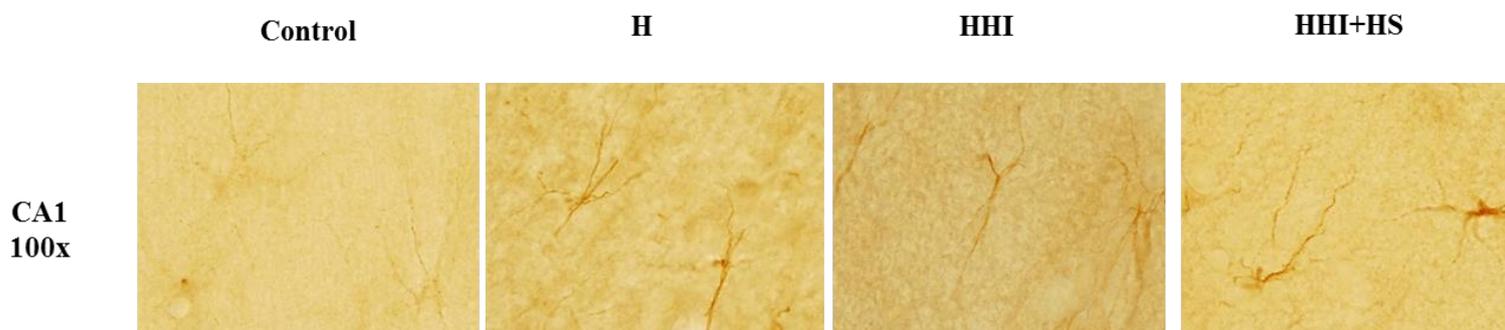


Figura 38 (C): Detección de la expresión de VEGF en el cerebro de ratas. (A) Western Blots representativos de la presencia de VEGF. β -actina indica la cantidad de muestra usada. (B) Análisis de la densidad óptica de las bandas usando el software Image J. La exposición a hipoxia severa (HS) no lleva a aumento significativo de la expresión de VEGF comparada con el grupo control, mientras que la expresión de VEGF después de la exposición intermitente a la hipoxia (HHI) y a hipoxia intermitente seguida de hipoxia severa (HHI+HS) aumenta significativamente con relación al grupo control y al grupo expuesto a hipoxia severa (HS). (C) Expresión de la proteína VEGF en cortes de cortex cerebral de ratas con un aumento de células positivas en el grupo HHI+HS cuando comparado con el grupo control. La hipoxia intermitente antes de la hipoxia severa tiene un efecto protector directo sobre las neuronas estimulando el crecimiento de los axones, la promoción de la división, migración y supervivencia de las células gliales, a través de la estimulación y liberación de VEGF. Los resultados son expresados como cantidades relativas de proteína. Los datos se presenta como media \pm DEM; (n=6). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

4.2.7. Expresión de Proteínas Antiapoptóticas

Las proteínas de choque térmico están relacionadas con la inhibición o inactivación de proteínas apoptóticas como citocromo c, caspasa3 y AIF (Stetler, A. et al., 2008). Analizamos la expresión de las proteínas Hsp70 y Hsp27 en respuesta a la hipoxia severa antes y después de exposición intermitente a hipoxia moderada. La Hsp27 actúa directamente en la neuroprotección y funciona como proteína antioxidante, mientras se ha demostrado que la sobreexpresión de Hsp70 se asocia con la reducción

de la liberación del citocromo c de la mitocondria, es de suponer que lleva a una reducción de los eventos apoptóticos cascada abajo. (Matsumori).

HSP70

Como se muestra en la Figura 39. La proteína Hsp70 expresó niveles más altos que los animales en normóxia en todos los grupos que experimentaron hipoxia, lo que indica que siempre que haya hipoxia, ya sea hipoxia hipobárica o normobárica, en este caso, hubo sobre expresión de esta proteína cito-protectora, sin embargo, ésta varía según el tipo de evento al que se exponen los animales: los mayores niveles se hallaron en el grupo que se sometió a hipoxia hipobárica intermitente después de la hipoxia a 7% FIO₂, el grupo HHI+HS. (Figura 39)

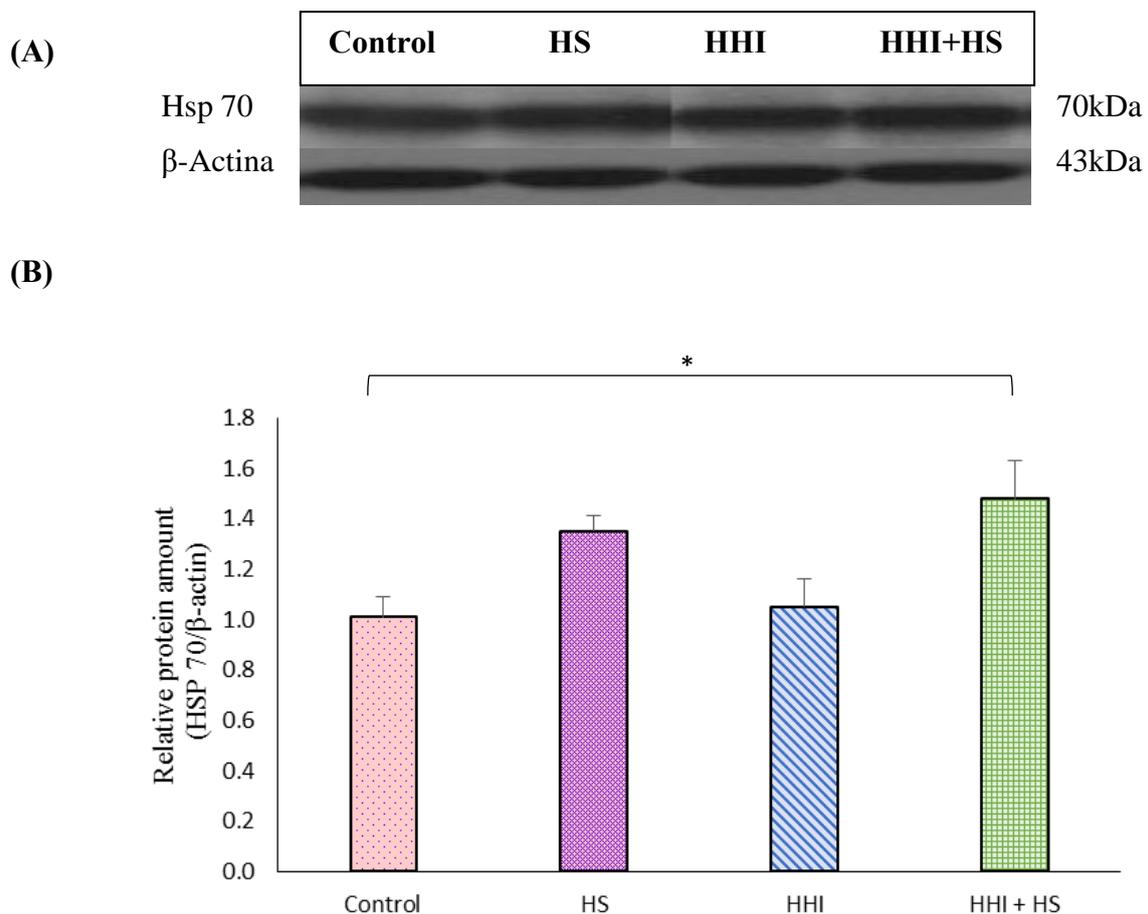


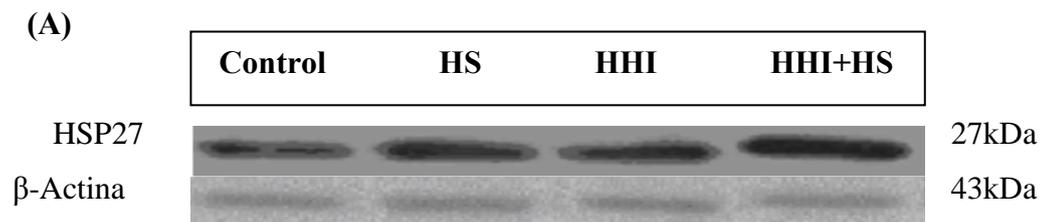
Figura 39: Expresión de la proteína HSP 70i los diferentes grupos experimentales (A y B). (A) representación gráfica de resultados de la prueba de Western Blot analizados en Image J, la expresión relativa del fragmento de 70 kDa respecto a la banda que corresponde a HSP70. (B) Los resultados muestran que el grupo HHI+HS sufrió un aumento significativo en relación

al grupo control. La β -actina se utilizó como control interno para la concentración de proteínas. Datos expresados respecto a la media \pm DEM., (n=6); siendo * $p \leq 0.05$.

HSP27

Los resultados (Figura 40 A, B y C) muestran que la exposición a hipoxia severa (HS) no induce cambios significativos en la expresión de HSP27 en el cerebro de las ratas comparados con el grupo control (normoxia) (0.98 ± 0.12 (HS) vs 0.98 ± 0.2 (control) unidades relativas de proteína), mientras que la exposición a hipoxia severa después de exposición intermitente a hipoxia moderada (HHI+HS) induce un aumento significativo ($p < 0.001$) en la expresión de Hsp27 en el cerebro comparado con el grupo control (normoxia) (3.08 ± 0.32 vs 0.98 ± 0.2 unidades relativas de proteína).

A Fig (C), a través de la inmunoreactividad para la proteína HSP27 ilustra los efectos protectores de la proteína contra el insulto de hipoxia severa en el grupo HHI+HS se observa un aumento de células positivas activadas por la hipoxia intermitente.



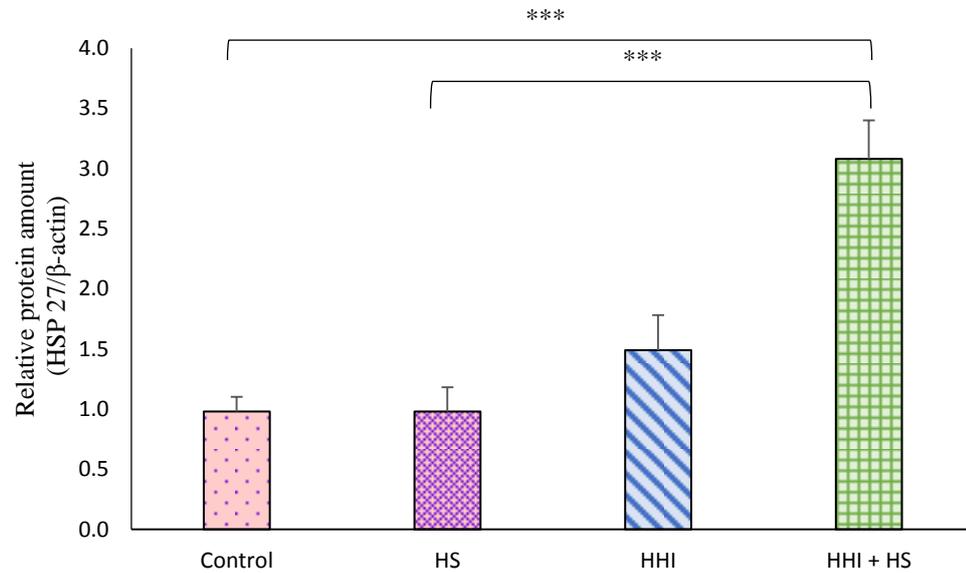
(B)

Figura 40: Expresión de la proteína HSP 27 en los diferentes grupos experimentales. (A) representación gráfica de resultados de la prueba de Western Blot analizados en Image J, la expresión relativa del fragmento de 27 KDa respecto a la banda que corresponde a HSP27. (B) Los resultados muestran que el grupo HHI+HS sufrió un aumento de casi 3 veces más en relación al grupo control y en relación al grupo HS. La β-actina se utilizó como control interno para la concentración de proteínas. Datos expresados respecto a la media ± DEM, (n=6); siendo *** $p \leq 0.001$.

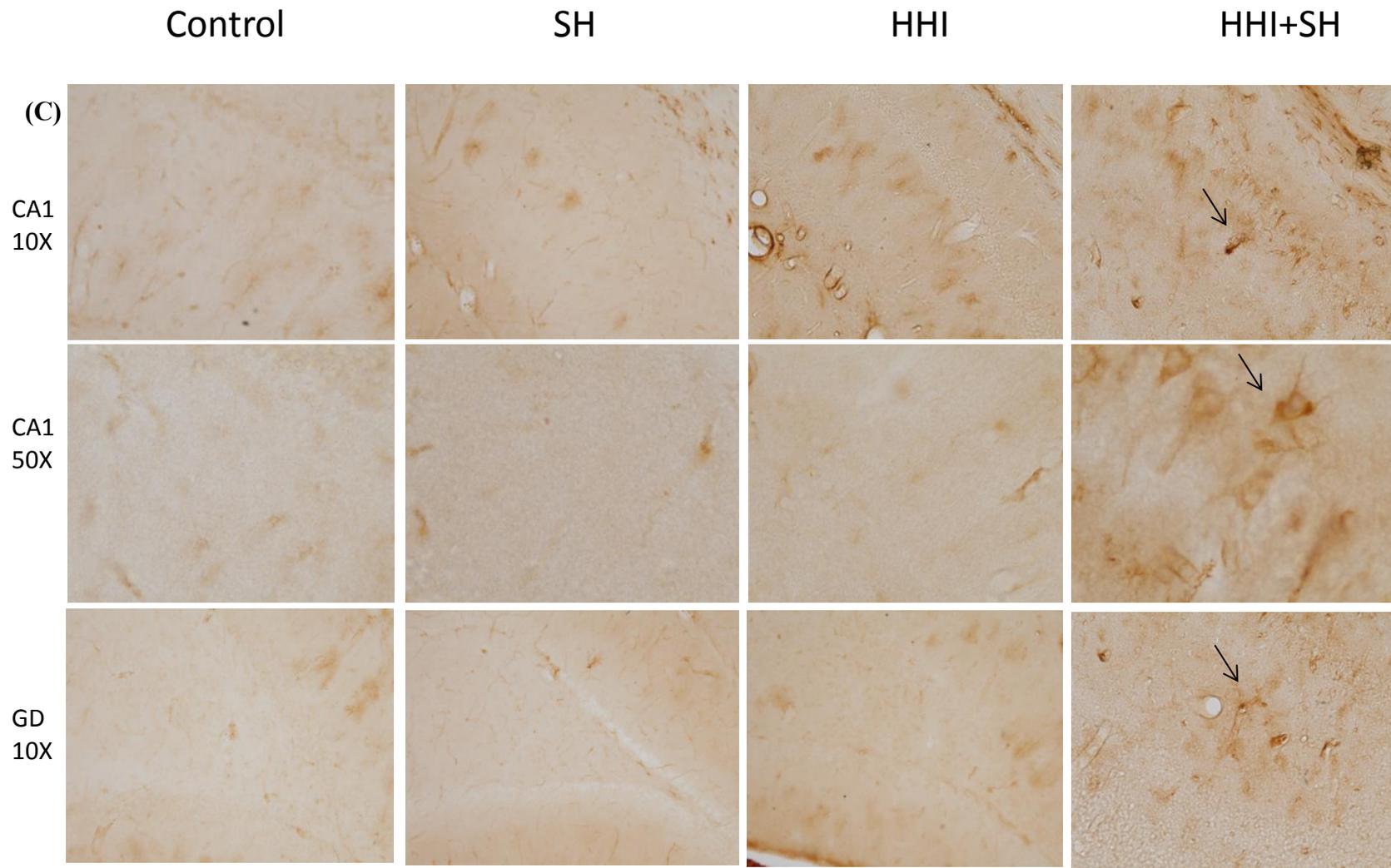


Figura 40 (C): El análisis por inmunohistoquímica fue empleado para detectar la expresión de la proteína HSP27 y se puede evidenciar un aumento de células positivas en el grupo HHI+HS cuando comparadas al grupo control y se evidencia que el grupo HS apenas a presenta una inmuno-reactividad asemejándose así al grupo control. La inmuno-reactividad se observa más en el hipocampo en las zonas de CA1 y GD. Barra de aumento 200µm.

GFAP

En respuesta al daño del cerebro los astrocitos experimentan astrogliosis. Los astrocitos reactivos defienden al SNC contra el estrés oxidativo. La astrogliosis implica un aumento en la síntesis de la proteína GFAP por los astrocitos y una hipertrofia de los cuerpos celulares y retracción de las prolongaciones celulares (Eddleston and Mucke, 1993; Hatten et al., Ridet et al., 1997). Los resultados muestran un cambio en la morfología de los astrocitos del grupo tratado con hipoxia severa (HS) además de un aumento en la síntesis de la proteína en la zona CA1 del hipocampo. Sin embargo estas variaciones no se observaron en el grupo HHI, en el que se observa un aumento en la expresión de la proteína mientras que las prolongaciones de los astrocitos se mantienen bien, mientras que en el grupo HHI+HS se observa algunas alteraciones que sugieren una disminución en la astrogliosis. (Figura 41).

Control

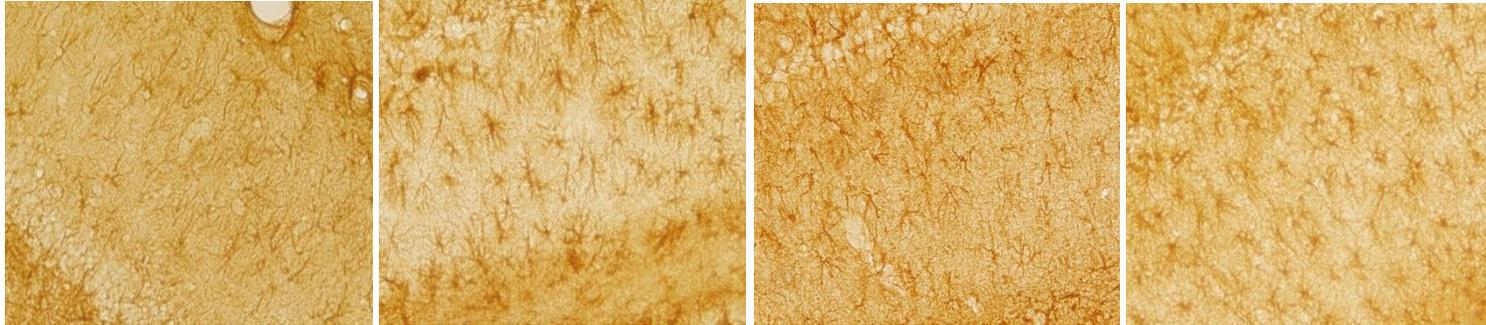
HS

HHI

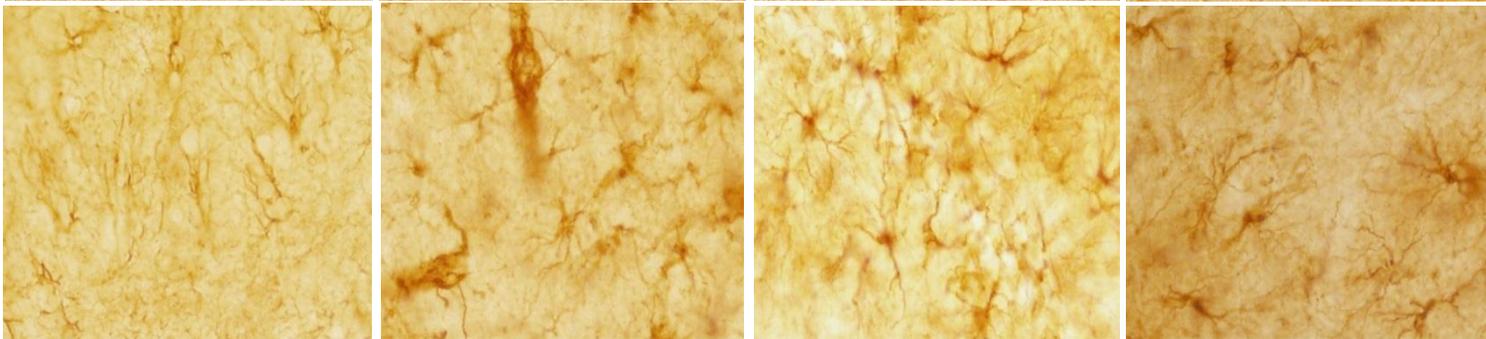
HHI+HS

GFAP

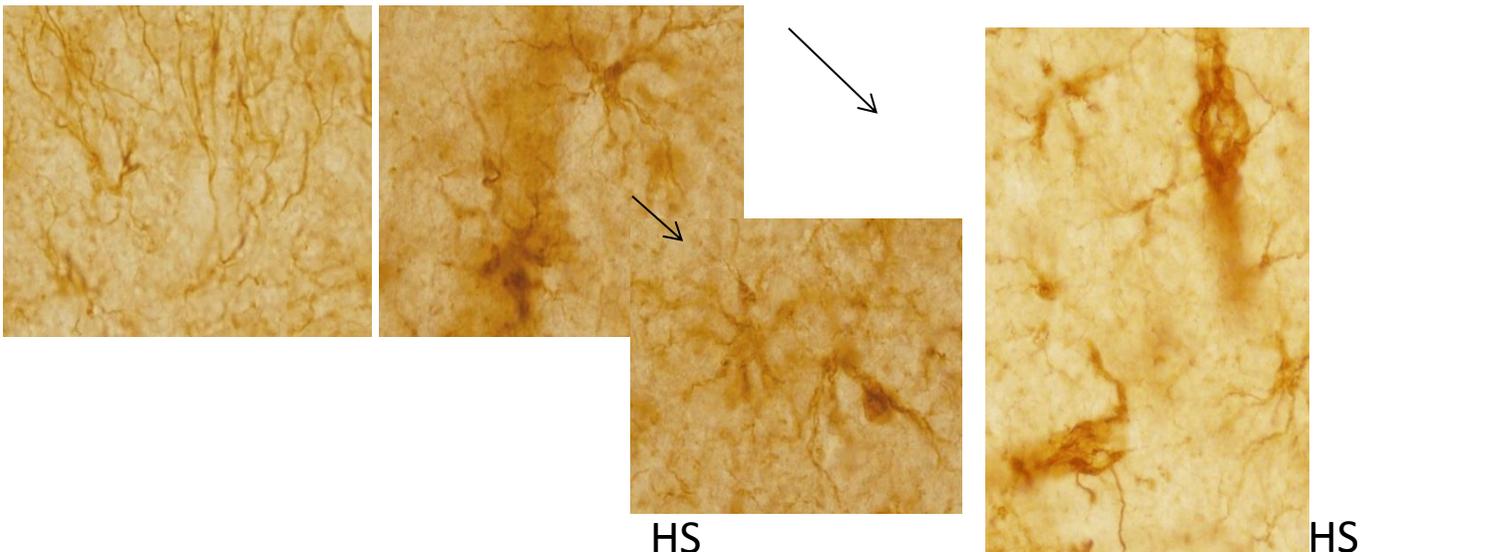
**CA1
20x**



**CA1
50x**



**CA1
100x**



**HS
CA1
100x**

**HS
CA1
100x**

Figura 41: Astroglisis detectada por inmunohistoquímica para GFAP. La exposición a hipoxia severa (HS) provoca una astroglisis, observándose un incremento de la proteína GFAP, así como un cambio en la morfología de los astrocitos. Estos cambios no se observan en los otros grupos. En los grupos HHI y HHI+HS se observa un incremento en la síntesis de la proteína GFAP, pero no indica una astroglisis. Barra de escala en las fotos con aumento de 20x 50µm y 15 µm en las de 100x.

V.- Discusión

5.1 Efecto de la hipoxia respiratoria aguda severa y de la re-oxigenación sobre el cerebro

5.1.1. *La hipoxia respiratoria aguda severa induce hipoxia en el cerebro.*

Los resultados revelan que las 5 h de exposición a la hipoxia los valores de los principales indicadores del contenido gases respiratorios (PaO_2 , SaO_2 , PaCO_2) y pH observados en la sangre de las ratas unido a los niveles de expresión de HIF-1 en el cerebro confirman que la exposición de las ratas a una hipoxia respiratoria normobárica ($\text{FiO}_2 = 7\%$) durante 6 h., causa hipoxia en los tejidos y específicamente en el cerebro. Los valores de la presión parcial arterial de oxígeno (PaO_2) y de la saturación arterial de oxígeno (SaO_2) en los animales durante la exposición a la hipoxia eran significativamente diferentes de los observados en animales normóxicos. El aumento de los niveles de HIF-1 en el cerebro de las ratas confirman que la exposición a hipoxia respiratoria definida en nuestro estudio causa hipoxia en el cerebro, pues un aumento en la expresión de HIF1 es un indicador de hipoxia (Jain y col., 2013). Estos resultados coinciden con los encontrados por otros autores (Hu 2009).

Los resultados muestran que la exposición a la hipoxia respiratoria severa aguda induce un aumento de los marcadores pro-oxidantes (aumento de la peroxidación de lípidos, oxidación proteínas y aumento de la síntesis de NO) y una disminución de los principales sistemas antioxidantes (disminución de la actividad de la SOD y una disminución del sistema glutatión debido principalmente por un aumento del consumo de la GSH) que caracteriza la presencia de estrés oxidativo en el cerebro de las ratas expuestas a la hipoxia respiratoria. Estos resultados corroboran resultados anteriores (Jefferson y col., 2004; Maiti y col., 2006; Himadri 2010).

5.1.2. *La hipoxia respiratoria aguda severa induce estrés oxidativo en el cerebro.*

Es bien conocido que bajo condiciones de hipoxia las células aumentan la producción de ROS que puede llevar a un aumento del estrés oxidativo (Jefferson y col., 2004; Maiti y col., 2006; Himadri y col., 2010). La intensidad del estrés es proporcional al tiempo de exposición y a la severidad de la hipoxia (Himadri y col., 2010). Bajo condiciones de hipoxia, la reducida presión parcial de O_2 disminuye la disponibilidad de O_2 dentro de la célula produciéndose una acumulación de equivalentes reductores en la cadena de transporte mitocondrial que lleva a un aumento en la

formación de ROS (Guzy y Schumaker, 2006) aunque hay cierta controversia sobre si la hipoxia aumenta la generación de ROS por la mitocondria (Chen y Lesnefsky, 2006; Schild y Reiser, 2005; Abramoc y col., 2007).

La hipoxia aumenta los niveles de NO en el cerebro. Ha sido descrito que la liberación excesiva de glutamato extracelular, tal como la que induce la hipoxia, lleva a un aumento en la concentración intracelular de Ca^{2+} a través del receptor NMDA (Hardingham, 2009). La activación de NMDA conlleva la activación de la NOS dependiente de Ca^{2+} y el aumento de la producción de NO. A través de la reacción de Haber-Weiss, el NO^{\bullet} combina con $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 para formar OH^{\bullet} y peroxinitrito (ONOO^-), aumentando así el estrés oxidativo. Estos dos últimos radicales son los radicales libres más reactivos producidos en los sistemas biológicos. ONOO^- se genera en niveles altos durante la hipoxia (Lipton, 1999) y contribuye fuertemente a daño cerebral y la peroxidación lipídica de la membrana (Bolaños y Almeida, 1999). La exposición a hipoxia aguda severa produce un aumento de TBARS, AOPP, indicadores de la oxidación de lípidos y proteínas respectivamente (Gutteridge y Halliwell, 2000) considerados como marcadores de estrés oxidativo. El aumento de la peroxidación de lípidos y la oxidación de proteínas observado en el cerebro de las ratas expuestas a la hipoxia durante 6 horas son indicadores del estrés oxidativo inducido por la hipoxia. Estos resultados están de acuerdo con los señalados en estudios previos.

La actividad neuronal depende de la producción de ATP por la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. En este proceso hay una formación del radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) que si no es neutralizado puede convertirse en un iniciador de la formación del radical hidroxilo y peroxinitrito, las dos formas de radicales más agresivas para los sistemas biológicos y especialmente para el cerebro (Sharp y Bernaudine, 2004). La superóxido dismutasa (SOD), una enzima que cataliza el anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno desempeña un papel importante en la prevención del estrés oxidativo inducido por la hipoxia en la célula (Fridovich, 1995). Nuestros resultados muestran que la exposición a la hipoxia respiratoria induce una disminución significativa de la actividad SOD en el cerebro. La disminución de los niveles de SOD inducido por la hipoxia pueden contribuir al estrés oxidativo observado en nuestros resultados. Por el momento, no sabemos por qué la hipoxia disminuye la actividad de la SOD. Ha sido propuesto que una excesiva formación de H_2O_2 es la causa de la inhibición de la actividad de SOD (Nieber, 1999). En la hipoxia, la formación

inicial del anión superóxido puede ser convertido en peróxido de hidrógeno por la SOD y el peróxido de hidrógeno resultante catalizado a agua por GSH. Sin embargo, si se mantiene la hipoxia, la disminución de la SOD inducida por la hipoxia unida a la consumida en la catalización del ión superóxido lleva a una depleción de la SOD. Si la exposición a la hipoxia se prolonga, la capacidad antioxidante disminuye mientras que aumenta la producción de radicales libres. El aumento de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y NO^{\cdot} aumentan la formación de OH^{\cdot} y $ONOO^-$ y llevan al cerebro a un estado de estrés oxidativo.

El glutatión reducido (GSH), el principal antioxidante celular en el cerebro (Aoyama, 2008), neutraliza directamente al peróxido de hidrógeno formado a partir del radical superóxido por la SOD. La disminución significativa de los niveles de GSH observada después de la exposición a hipoxia puede resultar de una mayor utilización de GSH para eliminar los radicales libres inducidos por la hipoxia unida a una inhibición de la síntesis de GSH. La disminución de la relación GSH/GSSG indica que la conversión de GSSG a GSH ha sido afectada (Singh y col., 2001). En condiciones fisiológicas, la recuperación de los niveles de GSH consumida en el mantenimiento de la homeóstasis redox celular corre a cargo del enzima glutatión reductasa (GR) que utilizando NADPH como cofactor convierte la GSSG en GSH, manteniendo así el poder antioxidante celular. Los resultados muestran que después de 6 h de exposición a la hipoxia, hay una disminución en la actividad de la glutatión reductasa (GR). hipoxia causa una disminución significativa en la actividad de GR, que puede causar una disminuir los niveles de GSH. De esta forma la hipoxia causa una disminución del principal mecanismo antioxidante del cerebro facilitando la aparición y aumento del estrés oxidativo en el cerebro. Estos resultados concuerdan con los observados por otros autores (Maiti y col., 2006; Himadri 2010).

5.1.3. La hipoxia respiratoria causa alteración en las mitocondrias y activa la cascada apoptótica en el cerebro.

El estrés oxidativo es un potente iniciador de la apoptosis. Es conocido que los radicales libres, junto con su acción directa sobre los lípidos, proteínas y ADN que conducen a daños en las estructuras celulares, también causan cambios en las mitocondrias (Duchen, 2000; Nicholls, 2009). La mitocondria puede ser diana de sus propios radicales (Langley y Ratan, 2004; Nicotera et al, 1999) que le pueden causar daños en su estructura y función. La disfunción mitocondrial se correlacionan con alteraciones en el complejo de transporte de electrones y con un aumento de la

producción de ROS que a su vez agrava la disfunción mitocondrial dando lugar a un círculo vicioso (Williams y col., 1998) que puede llevar a la activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Los radicales libres inducen apoptosis en un proceso que está asociado con la liberación por las mitocondrias de citocromo c y del factor inductor de apoptosis (AIF) junto con la activación de la cascada de las caspasas (Green y Kromer, 2004). Los resultados de nuestro estudio muestran que después de 6 h de exposición a hipoxia hay un aumento significativo del citocromo c y una tendencia a aumentar los niveles de AIF en el citosol. El aumento en el citosol de los niveles de citocromo c y de AIF son importantes mediadores en la activación de la cascada apoptótica vía caspasas facilitando la activación de la caspasa efectora de apoptosis, la caspasa 3. Ha sido propuesto que el aumento de los niveles de AIF en el citosol debido a alteraciones de la membrana mitocondrial, contribuye a aumentar la activación de la caspasa 3 desde la caspasa 9, contribuyendo a aumentar el daño celular. AIF también se trasloca al núcleo donde induce la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, contribuyendo a la muerte neuronal por una vía independiente de las caspasas (Lee y col., 2012 y Wang, 2015). Los resultados de la exposición a la hipoxia respiratoria tanto los obtenidos por inmunobloting como por inmunohistoquímica muestran un ligero aumento de la actividad de caspasa 3 en el cerebro especialmente en el giro dentado y la región CA3.

5.1.4. La re-oxigenación restaura el equilibrio redox y reduce la actividad apoptótica inducida por la hipoxia

En nuestro estudio, la re-oxigenación induce la recuperación de los efectos inducidos por la hipoxia respiratoria. La intensidad del estrés oxidativo causado por la hipoxia disminuye después de 24 h de re-oxigenación. En este tiempo, la actividad pro-oxidante (peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y formación de NO) disminuye mientras que la actividad antioxidante (actividad SOS y sistema glutatión) recupera los valores normales. Después de 48 h de re-oxigenación, la actividad pro-oxidante y la actividad oxidante del cerebro de las ratas expuestas a la hipoxia respiratoria recuperan el equilibrio redox. Los resultados muestran una disminución progresiva de los niveles de TBARS y AOPP y de los niveles de NO después de 24 h y 48 h de re-oxigenación. Después de 24 h de re-oxigenación se mantiene reducida la actividad SOD y retorna la actividad normal después de 48 h de re-oxigenación. Después de 24 h de re-oxigenación hay una recuperación de la actividad GR y de los niveles de GSH y después de 48 h la

relación GSH/GSSG vuelve a los valores observados en el cerebro de las ratas normóxicas. Después de 48 h de reoxigenación los niveles de actividad pro-oxidante y de actividad antioxidante no difieren de los niveles observados en el cerebro de las ratas normóxicas.

A diferencia con lo que ocurre con el estrés oxidativo, la mayor actividad apoptótica ocurre en las primeras 24 h de re-oxigenación. Durante la reoxigenación los niveles de citocromo c muestran una tendencia a disminuir. Después de 24 h de re-oxigenación los niveles de citocromo c se mantiene significativamente mayores que los niveles del grupo control, volviendo a los valores normales a las 48 h de reoxigenación. Los niveles de AIF alcanzan el mayor nivel después de 24 h de reoxigenación y vuelve a valores basales a las 48 h de reoxigenación. Ha sido propuesto que la presencia de AIF en el citosol por alteración de la membrana mitocondrial contribuye a la formación de la caspasa 3 desde la caspasa 9, participando en aumentar el daño celular. También AIF se transloca al núcleo donde induce la condensación de la cromatina nuclear y la fragmentación del ADN (Wang, 2015) contribuyendo a la muerte neuronal, por una vía independientemente de las caspasas (Lee, et al. 2012). Tanto los resultados obtenidos por western blot como por inmunohistoquímica muestran un aumento significativo de la actividad de la caspasa 3 después de 24 h de re-oxigenación, especialmente en el giro dentado y la región CA3 del hipocampo y retorna a los valores del grupo control después de 48 h de reoxigenación. Estos resultados están de acuerdo con otros (Hu y col., 2009).

Los resultados muestran que durante la exposición a una hipoxia respiratoria aguda severa los valores indicadores de estrés oxidativo, aparecen con el periodo de hipoxia y tienden a la normalidad con la re-oxigenación. Los marcadores de la disfunción mitocondrial y de apoptosis alcanzan su mayor intensidad a las 24 h de re-oxigenación post-hipoxia cuando ya no se observa estrés oxidativo. Estas diferencias en el tiempo, con estado de estrés en el periodo de hipoxia y normalizado a las 24 h de re-oxigenación y una activación de la apoptosis con mayor intensidad después de 24 horas de re-oxigenación no habían sido descritos hasta el momento. Sin embargo, esta situación coincide con la ya descrita en los eventos que ocurren durante la isquemia (Dirnagl y col., 1999). En el tiempo, desde el momento en que la hipoxia causa una caída en los niveles de ATP que afecta seriamente a la actividad de las ATP-ases causando la despolarización generalizada y la liberación excesiva de glutamato, los

mecanismos excitotóxicos vía estrés oxidativo pueden causar daños en neuronas y glía. Además, la excitotoxicidad dispara una serie de acontecimientos que contribuyen aún más al daño del tejido cerebral. Tales eventos incluyen los mecanismos más retrasados de la muerte celular programada (Dirnagl y col., 1999).

Nuestros resultados muestran que los efectos de la reoxigenación después de la exposición a la hipoxia respiratoria son diferentes a los efectos descritos en la reoxigenación post isquémica aunque tanto en la hipoxia respiratoria como en la hipoxia isquémica causada por disminución del flujo de sangre al cerebro, el estrés oxidativo y la apoptosis son mecanismos determinantes del daño cerebral (Granger y Kvietyts, 2015). El método principal para reducir o prevenir el daño neurológico a los pacientes que sufren isquemia por ictus, es restablecer pronto el flujo sanguíneo al tejido isquémico. Sin embargo, paradójicamente, la restauración del flujo sanguíneo causa daño adicional y agrava los déficits neurocognitivos entre los pacientes que sufren un evento isquémico cerebral. La reoxigenación que sigue a la hipoxia induce generalmente la generación por las mitocondrias de ráfagas de ROS (Sandersen y col., 2013), que no sólo causan el daño oxidativo en la fisiopatología de la hipoxia/reoxigenación sino también activan los mecanismos de señalización que, en parte sinergizan y en parte se oponen a los mecanismos inducidos por la hipoxia. En consecuencia, se hace a menudo difícil distinguir lo que es atribuible a la hipoxia y lo que es a la reoxigenación que sigue a la hipoxia. De acuerdo con nuestros resultados, la reoxigenación después de una exposición a hipoxia severa no solo no induce un estrés oxidativo si no que restaura el equilibrio redox celular alterado por la hipoxia.

Muchos de los efectos de la hipoxia implican la mediación de factores de transcripción: proteínas que regulan la expresión de genes. HIF es el mediador central de la respuesta a la hipoxia (Wang y col., 1995). A nivel transcripcional, HIFs funcionan como un regulador maestro de la homeostasis de oxígeno mediante el control de la oferta y la demanda de oxígeno. HIFs son proteínas heterodiméricas que consiste de una subunidad HIF- α regulada por el O₂ y una subunidad HIF- β expresada constitutivamente en las células. La expresión de la subunidad HIF- α puede ser inducida por una serie de vías, y su degradación es muy sensible a los niveles de O₂. En condiciones de normoxia, en presencia O₂ y α -cetoglutarato la HIF- α es modificada por las diogenasas PHD2 y FIH-1. Esta forma de HIF- α se une a la proteína de von Hippel-Lindau (VHL) que recluta a un complejo ligasa de ubiquitina ligasa que marca a la

HIF- α para su degradación proteasomal (Prabhakar y Semenza, 2015). Durante la hipoxia, HIF- α se acumula rápidamente en el núcleo de la célula y desencadena la expresión génica. En la hipoxia tisular, la disminución de los niveles de O₂ y/ o el aumento de la producción de ROS puede inhibir las hidroxilasas y aumentar la estabilidad de HIF- α . La presencia de altas concentraciones de ROS generadas a partir de las mitocondrias facilitan la estabilización de HIF-1 α (Chandel y col., 2000; Agani y col., 2000; Bell y Chandel, 2007). ROS puede ser producido en el citosol por otros mecanismos distintos de la fosforilación oxidativa mitocondrial, por acción de NADPH oxidasas y de la xantina oxidasa y ROS puede jugar un papel más importante en la expresión HIF1 α durante normoxia que en hipoxia (Haddad y Land, 2001). En la condición de hipoxia, HIFs se unen a la secuencia de consenso 5'-RCGTC-3, conocida como HRE (Hypoxia-Response Elements) presente en el promotor de cientos de genes (Ratcliffe y col., 1998) funcionalmente relacionados con la respuesta a la hipoxia, incluyendo la regulación de EPO (Ebert y Bunn, 1999), VEGF (Pugh y Ratcliffe, 2003) y varios implicados en favorecer el cambio de metabolismo oxidativo a glucolítico en condiciones de hipoxia (Fukuda y col., 2007). Hay dos dominios de activación transcripcional en HIF-1 α referidos como dominio de activación N-terminal y el dominio de activación C-terminal. Entre estos dos dominios está el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODD) (Huang y col., 1998).

Nuestros resultados muestran que en el cerebro la exposición a la hipoxia induce una mayor actividad de HIF-1 α al final de la exposición a la hipoxia ($p < 0.001$). Después de 24 h y 48 h de re-oxigenación hay una tendencia a una disminución de los niveles de actividad HIF-1 α que se mantienen significativamente por encima de la actividad del grupo control. Con la vuelta a la normalidad del contenido de O₂ en el tejido cerebral era de esperar una disminución en los niveles de HIF-1 α . Sin embargo, HIF-1 α puede ser estabilizado por otros mecanismos diferentes a la hipoxia (Qutub y Popel, 2008). La formación de ROS vía NADPH es un mecanismo de estabilización de HIF-1 α (Moona y col., 2010). Estabilización de HIF-1 α durante re-oxigenación ha sido descrita en el riñón (Conde y col., 2012).

Otro factor de transcripción descrito como implicado en la respuesta a la hipoxia es el factor NF κ B (Himadri y col., 2010). NF κ B es un pluripotente factor de transcripción implicado en la regulación de múltiples procesos celulares, incluyendo la respuesta inflamatoria donde generalmente protege a las células induciendo la expresión

de genes que codifican proteínas antioxidantes y antiapoptóticas. Durante la hipoxia el aumento del estrés oxidativo activa al factor de transcripción NFκB que a su vez activa genes que están implicados en procesos inflamatorios (IL-1, IL-6 y TNF-α) que pueden causar edema cerebral, que junto con el estrés oxidativo y la apoptosis, es uno de los principales mecanismos inducidos en el cerebro por la hipoxia severa. NF-κB es expresado constitutivamente a bajos niveles en el sistema nervioso central y es necesario para actividades celulares básicas (Birbach y col., 2002). En nuestros datos observamos un aumento significativo de NFκB después de 6 h de exposición a hipoxia un aumento significativo ($p < 0.01$) en la expresión de NFκB después de 6 h de exposición a hipoxia. Después de 24 h de reoxigenación, se observa una mayor acumulación en la región CAS del hipocampo. Ha sido descrito que la exposición a hipoxia causa un aumento gradual y significativo de la activación de NFκB desde las 3 h de exposición a hipoxia hasta las 48 h con una pica a las 24 h de exposición comparada con el grupo control (normoxia) (Himadri y col., 2010).

5.2. Efecto neuroprotector de la exposición intermitente a la hipoxia respiratoria moderada frente a la hipoxia respiratoria aguda severa

En un estudio previo observamos que la exposición intermitente a hipoxia moderada: (i) induce la expresión de Epo por el cerebro, un indicador de que la hipoxia intermitente causaba hipoxia en el cerebro, (ii) no induce estrés oxidativo en el cerebro, (iii) induce neuroprotección frente al estrés oxidativo inducido por ácido kainítico (Costa y col., 2013). Estos resultados sugieren que la exposición intermitente a la hipoxia puede ser una forma de inducir tolerancia o pre-acondicionamiento del cerebro frente a la hipoxia severa aguda. Precondicionamiento hipóxico o tolerancia inducida por la hipoxia, se refiere un breve periodo de hipoxia que protege contra un insulto letal (por ejemplo, stroke, hipoxia severa) minutos, horas o días después.

El pre-condicionamiento del cerebro es un fenómeno en el que el cerebro se protege contra el daño futuro mediante la adaptación a bajas dosis de insultos nocivos (Dirnagl y col., 2003).

5.2.1. La hipoxia respiratoria moderada intermitente induce hipoxia en el cerebro.

Dilucidado el efecto de la exposición a una hipoxia aguda severa, abordamos el posible efecto neuroprotector de la exposición intermitente a una hipoxia moderada frente a la hipoxia severa. Después de 8 exposiciones intermitentes a hipoxia moderada (cuatro horas/día durante 8 días a una presión barométrica equivalente a 4000 m. de altitud sobre el nivel del mar (Presión barométrica = 462 Torr; PO₂=97 mmHg) la eficacia del protocolo para causar hipoxia en el cerebro era confirmada por el aumento significativo de HIF y el aumento de eritropoyetina (Epo) en el cerebro de las ratas expuestas a la hipoxia intermitente. Estas dos proteínas son inducidas por la hipoxia (Marti, 2004). La exposición intermitente a la hipoxia respiratoria moderada induce hipoxia en el cerebro.

5.2.2. Efecto de la hipoxia respiratoria moderada intermitente en el cerebro

Los resultados muestran que después de 8 sesiones de exposición a hipoxia moderada, los indicadores de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y expresión de proteínas pro-apoptosis en el cerebro no difieren significativamente de los del cerebro del grupo control (normoxia). La exposición intermitente a hipoxia hipobárica moderada no induce estrés oxidativo ni apoptosis en el cerebro. Estos resultados están de acuerdo por los obtenidos en otros experimentos (Costa y col., 2013) y por otros autores (Jung y col., 2008). Igualmente la exposición a hipoxia intermitente no induce cambios significativos en los niveles de citocromo c, AIF y de la actividad de la caspasa 3 indicadores de apoptosis comparados con el grupo de normoxia. En consecuencia el protocolo de exposición intermitente a hipoxia moderada causa hipoxia en el cerebro sin inducir estrés oxidativo ni apoptosis. Claramente estos resultados muestran que la hipoxia intermitente moderada afecta de forma diferente al cerebro de cómo lo afecta la hipoxia severa aguda. La exposición a hipoxia severa aguda causa un estrés oxidativo resultante del aumento en la formación de radicales libres y de la disminución de la capacidad antioxidante así como disfunción mitocondrial, activación de la cascada apoptótica y un aumento de la actividad NFκB en el cerebro. Estos efectos no se observan en el cerebro de las ratas expuestas a la hipoxia hipobárica intermitente. En contraste, los resultados revelan que después de la exposición a la hipoxia respiratoria hipobárica intermitente, los indicadores del estrés oxidativo y de la apoptosis presentan niveles similares a los encontrados en el cerebro de las ratas normóxicas.

5.2.3. La hipoxia respiratoria moderada intermitente induce neuroprotección frente a la hipoxia respiratoria aguda severa.

El descubrimiento más significativo de este estudio es que la exposición a hipoxia intermitente moderada induce protección en el cerebro frente al estrés oxidativo y a la actividad apoptótica observado en el cerebro en ratas expuestas a hipoxia aguda severa.

En el caso de las ratas expuestas a hipoxia respiratoria severa, los resultados revelan aumento de los niveles de MDA, AOPP y NO, asociado con una disminución de la actividad de SOD y GSH en el cerebro, indicadores del estrés oxidativo. También se observa un aumento tanto en la actividad de caspasa 3 como en la actividad de NF- κ B indicadores de actividad apoptótica. Estos efectos de la exposición a hipoxia respiratoria aguda están significativamente reducidos en el cerebro de las ratas cuando son expuestas previamente a hipoxia intermitente. Específicamente, observamos que en el cerebro de las ratas expuestas a hipoxia severa, después de la exposición a hipoxia intermitente, comparadas con las expuestas solo a hipoxia severa, hay una reducción en la peroxidación lipídica, oxidación de proteínas y niveles de NO así como una mayor actividad de la SOD y GSH. Es decir, la exposición a la hipoxia severa en estas ratas no induce estrés oxidativo en el cerebro. Igualmente se observa una reducción en el cerebro de los niveles de citocromo c, AIF y actividad de la caspasa 3 comparadas con las expuestas directamente a la hipoxia severa. El pre-tratamiento con hipoxia intermitente protege al cerebro del estrés oxidativo y de apoptosis causado por la hipoxia severa.

HIF-1 está considerado como el factor de transcripción responsable del mantenimiento de la homeóstasis del oxígeno en las células (Prabdar y Semenza, 2015). Los resultados confirman que en respuesta a la hipoxia tanto severa como intermitente hay un aumento significativo en la expresión de HIF-1 α . No hay diferencias entre los dos grupos expuestos a hipoxia severa aguda, (HS y HHI+HS). El acondicionamiento con exposición a hipoxia intermitente no modifica la respuesta a la hipoxia aguda severa. Los resultados están de acuerdo con que la hipoxia estabiliza a la subunidad HIF-1 α y confirman que el protocolo de hipoxia intermitente, que no causa estrés oxidativo, si causa hipoxia en el cerebro y activa al principal mecanismo de respuesta a la hipoxia. Nuestros resultados estadísticamente no son lo suficientemente significativos que permitan asegurar que existan diferencias en la expresión de HIF-1 α entre la hipoxia intermitente y la hipoxia severa aguda. En todo caso, de confirmarse podría

indicar que la estabilización de la subunidad HIF-1 α depende principalmente del grado de hipoxia y no del estrés oxidativo que es diferente entre el grupo HS y el grupo HHI+HS.

En relación con la respuesta a la hipoxia, HIFs son importantes por su participación en regular genes que codifican la EPO, VEGF y enzimas reguladoras de la glucólisis. Dos opciones diferentes mantienen la homeóstasis del oxígeno frente a la hipoxia. De una parte, procesos que lleven a aumentar el aporte de O₂, de otra procesos que lleven a disminuir el consumo de O₂. Entre los primeros destacan el aumento de la expresión de EPO (Semenza y Wang, 1992) y de VEGF (Forsythe y col., 1996). Entre los segundos, destacan una serie de transportadores de glucosa (GLUT 1 y GLUT3 y enzimas reguladores de la glucólisis (Semenza y col., 1994; (Sharp y Bernaudin, 2004; Kim y col., 2006).

La exposición intermitente a la hipoxia aumenta la expresión de Epo, siendo mayor en el grupo de animales expuestos a hipoxia aguda después de ser expuestos a hipoxia intermitente. En experimentos previos, en ratas expuestas a hipoxia intermitente el aumento en la expresión de Epo se correlacionaba con protección al estrés oxidativo inducido por ácido kainítico (Costa y col., 2013). En el cerebro la Epo no tiene actividad eritropoietica. El descubrimiento de una función protectora (Sanaka y col., 1998) ha sido posteriormente confirmado (Sirén y col., 2001; Digicaylioglu y Lipton, 2001; Brines y Cerami, 2005). La Epo del cerebro es sintetizada por neuronas y astrocitos donde actúa en forma paracrina. Su función en el cerebro no está del todo dilucidada si bien es aceptado que desempeña un papel antioxidante protegiendo a las células frente al estrés oxidativo. Nuestros datos muestran un aumento de la expresión de Epo en los animales expuestos a hipoxia aguda con relación a los animales normóxicos. Actualmente hay una abundante literatura confirmando el papel neuroprotector de la Epo a través de su unión con el receptor Epo en diferentes patologías neurodegenerativas ante estados de estrés oxidativo, isquemias, hipoxia (Digicaylioglu y Lipton, 2001; Noguchi y col., 2007; Wen y col., 2002; Nguyen y col., 2014), pero en todos los estudios usan principalmente variantes de Epo recombinante exógena. La Epo en el cerebro funciona a varios niveles, incluyendo la acción antioxidante, la prevención de apoptosis, promoción de angiogénesis. Epo es un neuroprotector especialmente prometedor, ya que potencialmente interviene en varios puntos de la vía apoptótica.

Otro gen activado por HIF-1 en respuesta a la hipoxia es el gen cuya activación lleva a inducir al factor VEGF que induce la angiogénesis. Los niveles de VEGF en los distintos grupos muestran un patrón como el de la EPO. Ambas son proteínas expresadas en respuesta de la hipoxia que tienen un efecto a largo plazo. Los niveles de VEGF en el cerebro de los animales expuestos a hipoxia severa aguda no difieren significativamente de los niveles del grupo control (normoxia). Sin embargo la exposición a la hipoxia intermitente induce un aumento significativo de los niveles de VEGF comparados con los animales expuesto a hipoxia aguda. Los niveles más altos de VEGF eran encontrados en el cerebro del grupo expuesto a hipoxia intermitente seguido de una exposición a hipoxia severa aguda. La exposición a hipoxia intermitente potencia la expresión de VEGF en los animales expuestos después a la hipoxia severa.

Junto con HIF, otro factor que ha llamado la atención por su implicación en la regulación de múltiples procesos celulares incluyendo la respuesta inflamatoria, la apoptosis y la supervivencia celular es el factor de transcripción NFκB (Hayden y Ghosh 2008). Un análisis más amplio de la función de NFκB demuestra como las funciones de NFκB varían dependiendo del entorno en el que se encuentran (Mattson y Meffert 2006; Ridder y Schwaninger 2009). La activación de NF-κB se produce en respuesta a una amplia gama de estímulos extracelulares e intracelulares, incluyendo la hipoxia y el estrés oxidativo (Bubici et al 2006; Melvin et al 2011).

Nuestros datos muestran que la exposición a hipoxia severa aguda induce un aumento significativo de la expresión de NFκB en el cerebro que es inhibido por la exposición previa a hipoxia intermitente. El preconditionamiento inducido por la exposición previa a hipoxia intermitente inhibe la activación de NFκB en las ratas expuestas a hipoxia aguda previamente expuestas a la hipoxia intermitente. El mecanismo por el cual la hipoxia induce la iniciación de transducción de señales por NFκB indica la implicación de los ROS, ya que la suplementación de antioxidantes podría bloquear la iniciación de la cascada de señalización de NFκB (Hansen et al. 2006). Sin embargo, como es el caso con otros estímulos, el proceso por el cual el estrés oxidativo activa NFκB es complejo. Interacción entre ROS y NFκB ha sido descrito según la cual el factor NFκB es un regulador negativo clave de la actividad oxidante inducida en respuesta al estrés oxidativo (Bubici et al. 2006). El efecto NFκB en la muerte neuronal y la supervivencia puede depender del tipo de célula y el momento de

la activación de NFκB (Pizza et al. 2002). La evidencia reciente resalta que dentro de la misma célula neuronal, la activación de diferentes dímeros NFκB puede tener efectos contrarios sobre la supervivencia neuronal (Mattson y Meffert 2006; Sarnico et al 2009). Nuestros datos confirman resultados previos en los que la hipoxia intermitente reduce los niveles de NF-κB inducidos por estrés oxidativo (Costa y col., 2013) y que NFκB aparece asociado con la apoptosis.

La exposición a la hipoxia intermitente, de acuerdo con la ausencia de estrés oxidativo observada, no induce apoptosis. Los niveles de citocromo c, AIF y caspasa 3 en el cerebro de las ratas expuestas a hipoxia intermitente no difieren de los valores observados en el cerebro del grupo control (normoxia). Sin embargo, en el cerebro de las ratas expuestas a hipoxia severa los niveles altos de citocromo c, AIF y caspasa 3 son indicadores de activación de la vía apoptótica. Este efecto apoptótico causado por la hipoxia severa aguda es inhibido cuando las ratas son preconditionadas por la hipoxia intermitente. La exposición al protocolo de hipoxia hipobárica intermitente induce mecanismos que protegen al cerebro de los mecanismos apoptóticos producidos por la exposición a hipoxia severa aguda.

Entre los diversos mecanismos que posee el organismo para protegerse del estrés oxidativo uno de los más importantes es la producción de proteínas de estrés o heat shock proteins (HSP). Entre las funciones descritas en las que intervienen las HSP esta su función antiapoptótica. Estos incluyen la inhibición de mediadores directos como Bax, así como reguladores indirectos de permeabilización de la membrana mitocondrial como la Akt para prevenir la formación de MOMP (canal permeable de la membrana mitocondrial), así como los eventos posteriores de la alteración mitocondrial para regular la formación del apoptosoma. Aquí estudiamos dos de la HSP que han sido implicadas en la respuesta a la hipoxia, la HSP 70 y la HSP 27. Los resultados muestran que la exposición intermitente a la hipoxia moderada no tiene efectos sobre la expresión de HSP 70. Los niveles de HSP 70 después de la exposición a la hipoxia aguda severa con preconditionamiento y sin preconditionamiento no muestran diferencias significativas. De acuerdo con nuestros resultados la HSP 70 no parece desempeñar un papel importante en la respuesta del cerebro a la hipoxia severa aguda. Sin embargo observamos una diferencia significativa entre la expresión de HSP 27 entre el cerebro de las ratas preconditionadas por exposición a hipoxia intermitente y expuestas a la hipoxia severa aguda con las expuestas a la misma condición pro no preconditionadas.

La inmunoreactividad muestra un aumento de células positivas activadas por la hipoxia intermitente. El efecto neuroprotector del preconditionamiento mediante hipoxia intermitente aparece asociado a un aumento significativo de la HSP 27 que confirma el papel anti-apoptótico de esta proteína frente al estrés oxidativo inducido por la hipoxia. HSP ha sido descrita como una proteína que inhibe la liberación de citocromo c y activación de caspasa-3 (Gabai, Sherman, 2002). Estos efectos han sido encontrados en nuestro estudio.

Astrocitos. Los astrocitos están involucrados en el soporte metabólico para las neuronas y les proporcionan nutrientes tales como el lactato para complementar las necesidades energéticas. Además, los astrocitos parecen ser la principal fuente de EPO (eritropoyetina) y GSH (glutatión reducido) en el SNC en situaciones de estrés. (Gabryel y Malecki, 2006)

Estudios anteriores han demostrado que en hipoxia isquémica, las neuronas no sobreviven si los astrocitos vecinos no son viables (Takano y col., 2009). Por lo tanto, es importante examinar cómo la hipoxia afecta a la función y la viabilidad de los astrocitos dado que los astrocitos tienen una concentración de GSH dos veces más alta que en las neuronas y que proporcionan la mayor parte de la EPO a las neuronas vecinas (Bolaños y col., 1999). Trabajos recientes sostienen que los astrocitos desempeñan un papel importante como sensores de hipoxia (Angelova y col., 2015). En comparación con las neuronas, los astrocitos son muy resistentes a la hipoxia debido a varios factores. En primer lugar, los astrocitos tienen grandes reservas de glucógeno que puede ser metabolizado a la glucosa y el lactato y suministro de energía durante hipoxia (Phelps, 1972). En segundo lugar, los astrocitos tienen una baja demanda de energía, a diferencia de las neuronas, que tienen una alta densidad de canales iónicos y requieren más ATP para mantener los gradientes iónicos. Por lo tanto, la desregulación iónica se produce lentamente en astrocitos (Silver y col., 1997). En tercer lugar, los astrocitos tienen un mayor nivel de GSH, que las neuronas y proporcionan GSH o sustratos para la síntesis de GSH a las neuronas (Chen y Swanson 2003). En nuestros experimentos, como los resultados demostraron, la hipoxia severa provocó un cambio en la morfología de los astrocitos, que se parecía a una estructura más difusa, comparada con una estructura fibrosa observada en normoxia. Una situación conocida como astrogliosis que implica un aumento de la GFAP en los astrocitos y una hipertrofia de los cuerpos celulares y

retacción de las prolongaciones celulares. Esto se correlaciona con la excitotoxicidad. Curiosamente, la hipoxia severa previa exposición a hipoxia intermitente mostraba una recuperación en la morfología celular.

A modo de resumen, los resultados permiten establecer que la exposición a hipoxia respiratoria aguda severa ($FiO_2 = 7\%$ de O_2 , durante 6 horas) causa hipoxia en el cerebro con un aumento del estrés oxidativo que incluye la reducción de la actividad antioxidante, así como una disfunción mitocondrial y aumento de la actividad apoptótica. El estrés oxidativo alcanza su mayor intensidad durante el periodo de hipoxia y disminuye hacia valores de normoxia, durante la posterior reoxigenación. La actividad apoptótica se inicia durante la exposición a la hipoxia y alcanza su mayor intensidad después de 24 h de reoxigenación.

El acondicionamiento mediante exposición a un protocolo de hipoxia hipobárica moderada intermitente (8 días, 4 h/día a una altitud simulada de 4000 m, induce neuroprotección. La exposición al protocolo de acondicionamiento induce la expresión de HIF-1 sin causar estrés oxidativo ni aumentar la actividad apoptótica mientras que induce la expresión de proteínas neuroprotectoras como la Epo y el VEGF. El acondicionamiento prepara al cerebro para tolerar el efecto de la hipoxia severa de modo que mantiene la actividad antioxidante, la función mitocondrial y facilita la expresión de factores considerados como neuroprotectores, tales como el aumento de la expresión de Epo, VEGF y HSP-27. El papel de los astrocitos, hasta ahora prácticamente ignorado como implicados en el efecto de la hipoxia sobre el cerebro, debe de ser considerado en próximos estudios sobre neuroprotección.

VI.- Conclusiones

Conclusiones:

1. La hipoxia severa causa en el cerebro de las ratas estrés oxidativo, resultado de un aumento en la formación de radicales libres y una disminución de la actividad antioxidante.
2. La actividad apoptótica iniciada durante la hipoxia es mayor después de 24 h de reoxigenación. Después de 48 h de reoxigenación, las actividades pro-oxidante y antioxidantes presentan valores normales.
3. El estrés oxidativo iniciado por la hipoxia precede en el tiempo a la cascada apoptótica.
4. La exposición intermitente a hipoxia hipobárica moderada causa hipoxia en el cerebro.
5. La exposición intermitente a hipoxia hipobarica moderada no causa estrés oxidativo ni actividad apoptótica.
6. La hipoxia intermitente induce mecanismos neuroprotectores del daño celular causado por la exposición a hipoxia aguda severa.
7. El factor de transcripción NF- κ B aparece asociado al daño cerebral inducido por la hipoxia aguda.
8. La neuroprotección inducida por la hipoxia intermitente frente a la hipoxia aguda severa está asociada con la inhibición de la vía apoptótica.
9. Las proteína de estrés HSP 27 y HSP 70 tienen comportamientos diferentes frente a la hipoxia severa. La HSP 27 está asociada con los mecanismos protectores antiapoptóticos. La proteína HSP 70 no participa en los mecanismos protectores frente a la hipoxia severa.
10. La hipoxia severa induce astrogliosis en el hipocampo. El preconditionamiento protege de la astrogliosis.

VII.- Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

Abramov A.Y., Scorziello A. y Duchen M.R. 2007. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and re-oxygenation. *J neurosci* 27: 1129-1138.

Adam-Vizi, V. 2005. Production of reactive species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 7: 1140-1149.

Adams J. y Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*; 281: 1322-1326.

Agani F.H., Pichiule P, Chavez J.C. y LaManna J.C. 2000. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J Biol Chem* 275:35863–35867.

Akins P.T., Liu P.K. y Hsu C.Y. 1996. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia. *Stroke* 27: 1682-1687.

Aluvila S., Mandal T, Hustedt E, Fajer P, Choe J.Y. y Oh KJ. 2014. Organization of the mitochondrial apoptotic BAK pore: oligomerization of the BAK homodimers. *J Biol Chem* 289:2537-2551.

Angelova P.A., Kasymov V. y Christie I. 2015. Functional oxygen sensitivity of astrocytes. *J Neurosci* 35: 10460-10473.

Arango-Davila C., Escobar-Betancourt M., Cardona-Gomez G.P. y Pimienta-Jimenez H. 2004 Pathophysiology of focal cerebral ischemia: fundamental aspects and its projection on clinical practice. *Revista de neurología*, vol. 39, no. 2, pp. 156-165.

Arcasoy M.O. 2008. The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin.

Brit J Haematol; 141: 14-31.

Arundine M. y Tymianski M. 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34(4-5):325–337.

Avery S.V. 2011. Molecular targets of oxidative stress. *Biochem J* 434:201-210.

Banasiak K.J., Xia Y. y Haddad G.G. 2000. Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol*; 62: 215- 49.

Bailey D.M., Taudof S, Berg R. y Lundby C. 2009. Increased cerebral output of free radicals during hypoxia: Implications for acute mountain sickness?. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297:R1283-1292.

Barsotti A., Fabbi P. y Fedele M. 2001. Role of advanced oxidation protein products and Thiol ratio in patients with acute coronary syndromes. *Clin. Biochem* 44: 605–11.

Beere H.M. 2004. The stress of dying: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis". *Journal of Cell Science*, Vol 117, No. 13, pp. 2641 – 2651.

Beere H.M. 2005. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways. *The Journal of clinical investigation*, vol. 115, no. 10, pp. 2633-2639.

Bell E.L. y Chandel N.S. 2007. Mitochondrial oxygen sensing: regulation of hypoxia-inducible factor by mitochondrial generated reactive oxygen species. *Essays Biochem.* 43:17–27.

Bergendi L., Benes L., Durackova Z. y Ferencik M. 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 6, 1865-1874.

Bergeron M., Gidday J.M., Yu A.Y., Semenza GL, Ferriero D.M. y Sharp F.R. 2000 Role of hypoxia-inducible factor-1 in hypoxia-induced ischemic tolerance in neonatal rat brain. *Ann Neurol*. Vol: 48., No.3, pp: 285-96.

Berlett B.S. y Stadtman E.R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272: 20313-20316.

Bernaudin M, Marti H.H. y Roussel S., 1999. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*; 19: 643-5.

Birbach A., Gold P. y Binder B.R. 2002. Signaling molecules of the NF- κ B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 277: 10842-10851.

Bolaños J.P. y Almeida A. 1999. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1411 (2-3):415-436.

Bonavia R., Inda M.M., Vandenberg S., Cheng S.Y., Nagane M., Hadwiger P., Tan P., Sah D.W., Cavenee W.K. y Furnari F.B. 2012. EGFR-v-III promotes glioma angiogenesis and growth through the NF- κ B, interleukin-8 pathway. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun*. 338(1):617-26. *Oncogene*. Sep 6;31(36):4054-66. doi: 10.1038/onc.2011.563. Epub 2011 Dec 5.

Bonfoco E, Krainc D., Ankarcrona M., Nicotera P. y Lipton S.A. 1995. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7162–7166.

Bonsdorff E. y Jalavisto E. 1948. A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis. *Acta Physiol Scand* 1948; 16: 150-70.

Boveris A. y Chance B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 134: 707–716.

Bradford M. y Williams W. 1976. New, Rapid, Sensitive Method for Protein Determination, Federation proceedings, vol. 35, no. 3, pp. 274-274.

Bredt D.S. y Snyder S.H. 1994. Nitric-oxide: A physiological messenger molecule. *Ann Rev Biochem*; 63: 175-95.

Brines M. y Cerami A. 2005. Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci*; 6: 484-94.

Brines M., Grasso G. y Fiordaliso F. 2004. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common betasubunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14907- 14912.

Broudy V.C., Lin N. y Brice M. 1991. Erythropoietin receptor characteristics on primary human erythroid cells. *Blood* 77: 2583-2590.

Bubici C., Papa S., Dean K. y Franzoso G. 2006. Mutual cross-talk between reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B: Molecular basis and biological significance. *Oncogene* 25:6731-6748.

Bulnes S. y Lafuente, J.V. 2007. VEGF immunopositivity related to malignancy degree, proliferative activity and angiogenesis in ENU-induced gliomas. *J Mol Neurosci*. 33(2):163-72.

Bunn H.F. y Poyton R.O. 1996. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol Rev* 76:839–885.

Buzsaki G., Kaila K. y Raichle M. 2007. Inhibition and brain work. *Neuron* 56: 771-783.

Camara K., Lesnefsky E.J. y Stowe D.F. 2010. Potential therapeutic benefits of

strategies directed to mitochondria. *Antioxid Redox Signal* 13:279–347.

Carbonell T. y Rama R. 2009. Respiratory hypoxia and oxidative stress in the brain. Is the endogenous erythropoietin an antioxidant?, *Current Chemical Biology*, vol. 3, no. 3, pp. 238-252.

Carreau A., E Hafny-Rahbi, B, Matejuk A., Grillon C. y Kieda C. 2011. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med* 15:1239-1253.

Chandel N.S., McClintock D.S. y Feliciano T. M. 2000. Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing. *J Biol Chem* 275:25130–25138.

Chandel N.S., Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu C.E., Simon M.C. y Schumacker P.T. 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95: 11715-20.

Chang S.C., Sikkema D. y Goldwass E. 1974. Evidence for an erythropoietin receptor protein on rat bone-marrow cells. *Biochem Bio-phys Res Comms* 1974; 57: 399-405.

Chen H. 2011. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxidants & redox signaling*, 14(8), pp.1505–17.

Chen J. y Simon R. 1997. Ischemic tolerance in the brain. *Neurology* 48: 306–311.

Chen Q. y Lesnefsky E.J. 2006. Depletion of cardiolipin and cytochrome c during ischemia increases hydrogen peroxide production from the electron transport chain. *Free Radic Biol Med* 15:976-982.

Chen Y. y Swanson R.A. 2003. Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:137–149.

Cheng, Emily H.Y. y Sheiko T.V. 2003. VDAC-2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science* 301:513-7.

Chin K., Yu X. y Beleslin-Cokic B., 2000. Production and processing of erythropoietin receptor transcripts in brain. *Brain Res Mol Brain Res* 81: 29-42.

Choi D.W. 1998. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11: 465-469.

Choi D.W. 1987. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7:369-379.

Clemens J.A. 2000. Cerebral ischemia: gene activation, neuronal injury, and the protective role of antioxidants. *Free Radic Biol Med* 28: 1526-1531.

Coimbra D.C., Alva, N., Trigueros, L., Gamez, A., Carbonell, T. y Rama, R. 2013, Intermittent hypobaric hypoxia induces neuroprotection in kainate-induced oxidative stress in rats. *Journal of molecular neuroscience : MN*, vol. 50, no. 3, pp. 402-410.

Conde E., Laura Alegre L. y Blanco-Sánchez. 2012. Hypoxia Inducible Factor 1-Alpha (HIF-1 Alpha) is induced during reperfusion after renal ischemia and is critical for proximal tubule cell survival. *PLoS ONE* 7 (3): e33258. doi:10.1371.

Connett R.J., Honig C.R., Gayeski T.E. y Brooks G.A. 1990. Defining hypoxia: a systems view of VO₂, glycolysis, energetics, and intracellular PO₂. *J Appl Physiol* 68: 833-842.

Costa D.C., Alva N., Trigueros L., Gamez A., Carbonell T. y Rama R. 2013. Intermittent hypobaric hypoxia induces neuroprotection in kainate-induced oxidative stress in rats. *J Mol Neurosci* 50: 402-410.

Costa L.E., Mendez G. y Boveris A. 1997. Oxygen dependence of mitochondrial function measured by high-resolution respirometry in long-term hypoxic rats. *Am J Physiol Cell Physiol* 273: C852–C858.

Costa S., Planchenault T., Charriere-Bertrand C., Mouchel Y., Fages C., Juliano S., Lefrançois T., Barlovatz-Meimon G. y Tardy M. 2002. Astroglial permissivity for neuritic outgrowth in neuron-astrocyte cocultures depends on regulation of laminin bioavailability. *Glia*. 37(2):105-13.

Coyle J.T. y Puttfarcken P. 1993. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262. 689-695.

Crompton M., Virji S., Doyle V., Johnson N. y Ward J.M. 1999. The mitochondrial permeability transition pore. *Biochem Soc Symp* 66: 167–179.

Cui J., Holmes E.H., Greene T.G. y Liu P.K. 2000. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. *FASEB J* 14: 955-967.

Cummins E.P. y Taylor C.T. 2005. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch.* 450, 363–371.

Currie R.W., Ellison, J.A., White, R.F., Feuerstein, G.Z., Wang, X. y Barone, F.C. 2000. Benign focal ischemic preconditioning induces neuronal HSP70 and prolonged astrogliosis with expression of HSP27. *Brain research*, vol. 863, no. 1-2, pp. 169-181.

D'Andrea A.D. y Zon L. 1990. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J Clin Invest* 1990; 92: 681-687.

Dewson G. y Kluck R.M. 2009. Mechanisms by which Bak and Bax permeabilise

mitochondria during apoptosis. *J Cell Sci* 122:2801-2808.

Digicaylioglu M. y Lipton SA. 2001. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappa B signalling cascades. *Nature*; 412: 641-7).

Digicaylioglu M., Bichet S. y Marti H.H. 1995. Localization of specific erythropoietin binding-sites in defined areas of the mouse-brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3717-3720.

Dirnagl U., Simon R.P. y Hallenbeck J.M. 2003. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci*;26:248–254.

Dirnagl U., Iadecola C. y Moskowitz M. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke:a view integrated. *Trends Neurosci* 22:391-397.

Dix M. M., Simon, G. M. y Cravatt, B. F. 2008. Global mapping of the topography and magnitude of proteolytic events in apoptosis. *Cell* 134: 679-691.

Dordal M.S., Wang F.F. y Goldwasser E. 1985. The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 116: 2293-2299.

Dröge W. 2002. Free radicals in physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47-49.

Duchen M. 2000. Mitochondria and calcium. From cell signalling to cell death. *J Physiol* 529:57-68.

Ebert B.L. y Bunn H.F. 1999. Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 94:1864-1877.

Edlich F., Banerjee S. y Suzuki M. 2011. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the

mitochondria into the cytosol. *Cell* 145:104-116.

Elliott S., Lorenzini T. y Asher S. 2003. Enhancement of therapeutic protein in vivo activities through glycoengineering. *Nat Biotechnol* 21: 414-421.

Erecinska M. y Silver I.A. 2001. Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Resp Physiology* 128: 263-276.

Fandrey J. 2004. Oxygen-dependent and tissue-specific regulation of erythropoietin gene expression. *Am J Physiol* 2004; 286: R977- R88.

Figuroa V. N. 2008. Originales Expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible en las enfermedades tiroideas autoinmunitarias. 55(8), pp.340–345.

Forsythe J.S. 1996. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hipoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16:4604-4613.

Franklin T.B., Krueger-Naug, A.M., Clarke D.B., Arrigo A.P. y Currie R.W. 2005. The role of heat shock proteins HSP70 and HSP27 in cellular protection of the central nervous system. *International journal of hyperthermia: the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, vol. 21, no. 5, pp. 379-392.

Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals: the superoxide radical is an agent of oxygen toxicity. Superoxide dismutases provide an important defense. *Science* 201: 875–880.

Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 64: 97-112

Fukuda R., Zhang H., Kim J.W., Shimoda L., Dang C.V. y Semenza G.L. 2007. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129: 111–122.

Funfschilling U. 2012. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature* 485: 517-521.

Gabai V.L. y Sherman M.Y. 2002. Invited Review: Interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock. *J Appl Physiol* 92; 1743-1748.

Gabryel B. y Malecki A. 2006. Ebselen attenuates oxidative stress in ischemic astrocytes depleted of glutathione. Comparison with glutathione precursors. *Pharmacol Rep* 58:381–392.

García N., Hopkins S.R. y Powell F.L. 2000. Effects of intermittent hypoxia on the isocapnic hypoxic ventilatory response and erythropoietin in humans. *Resp Physiol* 123: 39-49.

Genc S, Koroglu T.F. y Genc K. 2004. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res*; 1000: 19-31.

Gil N., Gomez, J.C. y Gomez, A., 2008. Radicales libres y lesión cerebral. *Univ Med. Bogotá (Colombia)*, pp.231–242. Available at: file:///D:/Alexita bonita revuelto universidad/AMaster/LAB/tesina/8-RADICALES.pdf. Accessed August 12, 2014.

Granger D.N. y Kvietys P.R. 2015. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol* 6:524-551.

Green D. y Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629.

Gutteridge J.M.C. y Halliwell B. 2000. Free radicals and antioxidants in the year 2000 - A historical look to the future. *Ann NY Acad Sci.* 899: 136-47.

Guzy R.D. y Schumaker P.T. 2006. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 91:807-819.

Haddad G.G y Jiang C. 1993. O₂ deprivation in the central nervous system: on the mechanisms on the neural response, differential sensitivity and injury. *Prog Neurobiol* 40: 277-318.

Haddad J.J. y Land S.C. 2001. A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF- α -dependent regulation of HIF-1 α . *FEBS Lett.* 505: 269–274.

Hail N.Jr., Carter B.Z., Konopleva M. y Andreeff M. 2006. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis* 11, 889-904.

Hall C.N., Klein-Flügge M.C., Howarth C. y Attwell D. 2012. Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing. *J Neurosci* 2012; 32: 8940–8951.

Halliwell B. 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 97: 1634-1658.

Halliwell B. 2001. Role of free radicals in the neurodegeneration diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging.* 18, 685-716.

Halliwell B. 1991. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am. J. Med.* 91, 14S-22S.

Halliwell B. y Gutteridge, J.M.C. 1989. *Free radicals in Biology and Medicine*, 2 ed. Clarendon Press Oxford.

Hamilton A.J., Trad L.A. y Cymerman A. 1991. Alterations in human upper extremity motor function during acute exposure to stimulated altitude. *Aviat Space Environ Med* 62:759-764.

Han D. Sen C.K., Roy S. Kobayashi M.S., Tritscher H.J. y Packer L. 1997. Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cell by thiol antioxidants. *Am. J. Physiol.* 273, R1771-R1778.

Hanisch U.K. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 40:2, p. 140–155.

Hansen J.M., Go Y.M. y Jones D.P. 2006. Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signalling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46:215–234.

Hardingham G.E. 2009. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans* 37: 1147–1160.

Hardingham G.E., Fu-kunaga Y., y Bading H. 2002. Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5: 405-414.

Harris J.J., Jolivet R. y Attwell D. 2012. Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75:762-777.

Hayashi T., Sakurai M., Itoyama Y. y Abe K. 1999. Oxidative damage and breakage of DNA in the rat brain after transient MCA occlusion. *Brain Res* 832: 159-163.

Hayden M.S., Ghosh S. 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132:344–362.

Hayden M.S., West A.P., Ghosh S. 2006. NF-κB and the immune response. *Oncogene* 25:6758–6780.

Heales S.J.R., Bolaños J.P., Stewart V.C., Brookes P.S., Land J.M. y Clark JB. 1999. Nitric oxide, mitochondria and neurological disease. *Biochim Biophys Acta-*

Bioenerg 1999; 1411: 415-36). *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* 1410: 215-28.

Hearse D.J., Humphrey S.M. y Chain E.B. 1973. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 5:395-407.

Himadri P., Sarada S., Kumari S., Chitharanjan M. y Dhananjay S. 2010. Role of Oxidative Stress and Inflammation in Hypoxia-Induced Cerebral Edema: A Molecular Approach. *High Alt Med Biol* 11:231–244.

Hissin P. y Hilf. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74, 214-226.

Hochachka P.W. 1998. Mechanism and evolution of hypoxia-tolerance in humans. *J Exp Biol* 201: 1243-1254.

Hochachka P.W., Buck L.T., Doll C.J. y Land S.C. 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9493-9498.

Hong C.J., Liu H.C., Liu T.Y., Lin C.H., Cheng C.Y. y Tsai S.J. 2003. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) Val66Met polymorphisms in Parkinson's disease and age of onset. *Neurosci Lett.* Dec 15;353(1):75-7.

Howarth C., Gleeson P. y Attwell D. 2012. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *J Cereb Blood Flow Metab.* 32: 1222–1232.

Hu D.Y. 2009. Normobaric hypoxia-induced brain damage in Wistar rat. *J Biomed Sci Engin* 2:632-36.

Huang L.E., Gu J., Schau M. y Bunn HF. 1998. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7987-7992.

Ikeda E. 2005. Cellular response to tissue hypoxia and its involvement in disease progression. *Pathol. Int.* 55: 603–610.

Imlay J.A. 2008. Cellular defense against superoxide and hydrogen peroxide. *Ann Rev Biochem* 77: 755-776.

Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S. y Kaelin W.G.J. 2001. HIF-alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292:464–468.

Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., von Kriegsheim A., Hebestreit H.F., Mukherji M., Schofield C.J., Maxwell P.H., Pugh C.W. y Ratcliffe P.J. 2001. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292:468–472.

Jacobs K., Shoemaker C., Rudersdorf R. 1985. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313: 806-810.

Jain K., Suryakumar G., Prasa y R., Ganju L. 2013. Upregulation of cytoprotective defense mechanisms and hipoxia-responsive protein imparts tolerance to acute hypobaric hipoxia. *High Alti Med Biol* 14: 65-77.

Jefferson S., Simoni J., Escudero E. y Hurtado M.E. 2004. Increased oxidative stress following acute and chronic high altitude exposure. *High Alt. Med. Biol.* 5:61–69.

Jelkmann W. 1992. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 72:449-489.

Jespersen S.N. y Østergaard L. 2012. The roles of cerebral blood flow, capillary transit time heterogeneity, and oxygen tension in brain oxygenation and metabolism.

J Cereb Blood Flow Metab 32: 264–277.

Jones D.P. 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8:1865-1879.

Jung M.E., Simpkins J.W., Wilson A.M. 2008. Intermittent hypoxia conditioning prevents behavioral deficit and brain oxidative stress in ethanol-withdrawn. *J Appl Physiol* 105:510-517.

Katayama B., Sato Y., Ishida K., Mori S. y Miyamura M. 1998. The effects of intermittent exposure to hypoxia during endurance exercise training on the ventilatory responses to hypoxia and hypercapnia in humans. *Eur J Appl Physiol* 78:189-194.

Katsura K., Kristian T. y Siesjö B.K. 1994. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 22: 991-996.

Keller J.N., Kindy M.S., Holtsberg, F.W., St Clair D.K., Yen H.C., Germeyer, A.; Steiner S.M., Bruce-Keller A.J., Hutchins J.B. y Mattson M.P. 1998. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* 18, 687-697.

Kilic E., Kilic U. y Soliz J. 2005. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1-2 and Akt pathways. *FASEB J* 19:2026-2028.

Kim J.W., Tchernyshyov I., Semenza G.L. y Dang C.V. 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3:177–185.

Knappen M.F., Zusterzeel P.L.M., Peters W.H.M. y Steegers E.A.P. 1999. Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction: a review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 82, 171–184.

Koken T. Inal M. 1999. The effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Clinica Chimica Acta*, vol. 288, no. 1-2, pp. 55-62.

Kumar P. y Prabhakar N.R. 2012. Peripheral chemorreceptores: function and plasticity of the carotid body. *Comp Physiol* 2:141-219.

LaManna J.C., Vendel L. y Farrell R. 1992. Brain adaptation to chronic hypobaric hypoxia in rats. *J Appl Physiol* 72: 2238-2243.

Langley B. y Ratan R.R. 2004. Oxidative stress-induced death in the nervous system: Cell cycle dependen or independent?. *J Neurosci Res* 77:621-629.

Lanza I.R. Tevald M.A., Befroy D.E. y Kent-Braun J.A. 2010. Intracellular energetics and critical PO₂ in resting ischemic human skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol- Regul Integr Comp Physiol* 299(5):R1415-R1422).

Lazarou M., Stojanovski D. y Frazier AE. 2010. Inhibition of Bak activation by VDAC2 is dependent on the Bak transmembrane anchor. *J Biol Chem* 285:36876-83.

Lee K., Roth R.A. y LaPres J.J. 2007. Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacol. Ther.* 113, 229–246.

Lee H.C. y Wei Y.H. 2007. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp. Biol.Med.* 232, 592-606.

Lee J.H., Cheon Y. H, Woo R.S., Song D. H., Moon C. and Baik T.K. 2012. Evidence of early involvement of apoptosis inducing factor-induced neuronal death in Alzheimer brain. *Anat Cell Biol.* 45(1):26-37.

Leithner C. y Roy G. 2014. The oxygen paradox of neurovascular coupling. *J cereb Blood Flow Metab* 34: 19-29.

Léveillé F., Gaamouch F. y Gouix E. 2008. Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *FASEB J* 22: 4258-4271.

Lewen A., Matz P. y Chan P.H. 2000. Free radical pathways in CNS injury. *J Neurotrauma* 17: 871-90.

Li H., Liu L., Xing D. y Chen W.R. 2010. Inhibition of the JNK/Bim pathway by HSP70 prevents Bax activation in UV-induced apoptosis. *FEBS letters*, vol. 584, no. 22, pp. 4672-4678.

Li C. y Jackson R.M. 2002. Reactive species mechanism of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C 227-C241.

Li L.M., Dubeau F. y Andermann F. 1997. Periventricular nodular heterotopia and intractable temporal lobe epilepsy: poor outcome after temporal lobe resection. *Ann Neurol* 1997,41:662-668.

Lin F.K., Suggs S. y Lin C.H. 1985. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 7580–7584.

Lindsten T., Ross A.J. y King A. 2000. The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues. *Mol Cell* 6:1389-99.

Lipton 1999. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431-1568.

Liu J., Narasimhan P., Yu F.S. y Chan P.H. 2005. Neuroprotection by hypoxic preconditioning involves oxidative stress-mediated expression of hypoxia-inducible factor and erythropoietin. *Stroke* 36: 1264-9.

Liu Y., Wong T.P. y Aarts M. 2007. NMDA receptors subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J. Neurosci*

27: 2846-2857.

Livnah O., Stura E.A. y Middleton S.A. 1999. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* 283: 987-990.

Locasale J.W. y Cantley L.C. 2011 Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab.* 14: 443 – 451.

Loor G. y Schumacker P. T. 2008. Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia-reperfusion. *Cell death and differentiation* 15, 686-690.

Lopez-Barneo J., Pardal R. y Ortega-Saenz P. 2001. Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol* 63: 259–287, 2001.

Lowen S.B., Cash S.S., Poo M. y Teich M.C. 1997. Quantal neurotransmitter secretion rate exhibits fractal behavior. *J Neurosci* 17: 5666–5677.

Lyons T.W., Reinard C.T. y Planavsky N.J. 2014. The rise of the oxygen in Earth's early ocean and atmosphere. *Nature* 506: 307-315.

Maa E.H. 2010. Hypobaric hypoxic cerebral insults: The neurological consequences of going higher. *NeuroRehabilitation* 26:73-84.

Madsen P.L., Cruz N.F., Sokoloff L. y Dienel G.A. 1999. Cerebral oxygen/glucose ratio is low during sensory stimulation and rises above normal during recovery: excess glucose consumption during stimulation is not accounted for by lactate efflux from or accumulation in brain tissue. *J Cereb Blood Flow Metab* 19: 393–400.

Maiese K., Li F.Q. y Chong Z.Z. 2004. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci* 25: 577-583.

Magistretti P.J. y Chatton J.Y. 2005. Relationship between L-glutamate-regulated

intracellular Na⁺ dynamics and ATP hydrolysis in astrocytes. *J Neural Transm* 112: 77-85.

Magistretti P.J., Pellerin L., Rothman D.L. y Shulman R.G. 1999. Energy on demand. *Science*. 283:496–497.

Maiti P., Singh S.B. y Sharma A.K. 2006. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int* 49: 709-716.

Mannervik B. 1999. Measurement of glutathione reductase activity. *Curr. Protocols Toxicol. Unit* 7.2.

Manning A.S., Coltart D.J. y Hearse D.J. 1984. Ischemia and reperfusion- induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ Res* 55:545–548.

Marder E. y Goaillard J.M. 2006. Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nat Rev Neurosci* 7: 563-574.

Marklund S.L., Westman N.G., Lundgren E. y Roos G. 1982. Copper-and zinc-cointaining superoxide dismutase, manganese-cointaining superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* 42, 1955-1961.

Marder E. y Goaillard J.M. 2006. Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nat Rev Neurosci* 7: 563-574.

Marshall B.E., Marshall C., Frasch F. y Hanson C.W. 1994. Role of hipoxic pulmonary vasoconstriction in pulmonary gas-eschange and blood-flow distributon. *Int Care Med* 20:291-297.

Martindale J.L. y Holbrook N.J. 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J Cel Physiol* 192: 1-15.

Marti H.H. 2004. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol* 207:3233-3242.

Marti H.H., Wenger R.H. y Rivas L.A. 1996. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J Neurosci* 8:666-676.

Martin R.L., Lloyd H.G. y Cowan A.I. 1994. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 17: 251-257.

Martindale J.L. y Holbrook N.J. 2002. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. *J Cel Physiol* 2002; 192: 1-15.

Martínez-Sámano J. y Torres Durán P.V. 2012. Effect of Acute Extremely Low Frequency Electromagnetic Field Exposure on the Antioxidant Status and Lipid Levels in Rat Brain. *Arch Med Res* 43 (3):183-9 PMID: 22560984.

Mattson M.P. y Meffert M.K. 2006. Roles for NF- κ B in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ* 13:852-860.

Melvin A., Mudie S. y Rocha S. 2011. Mechanism of hypoxia-induced NF- κ B. *Cell Cycle* 10:879-882.

Meerson F., Ustinovae y Orlova E. 1987. Prevention and elimination of heart arrhythmias by adaptation to intermittent high altitude hipoxia. *Clin Cardiol* 10:783-789.

Mills G.C. 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol.Chem.*229, 189-197.

Mink J.W., Blumenschine R.J. y Adams D.B. 1981. Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *Am.*

J. Physiol. 241, R203 – R212.

Mittal CK. y Murad F. 1977. Activation of guanylate cyclase by superoxide-dismutase and hydroxyl radical – Physiological regulator of guanosine 3'-monophosphate formation. Proc Natl Acad Sci USA 74:4360-4364.

Miyake T., Kung C.K. y Goldwasser E. 1977. Purification of human erythropoietin. J Biol Chem 252: 5558-64.

Moncada S., Palmer R.M.J. y Higgs E.A. 1991. Nitric-oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev 43: 109-42.

Moona E.I., Sonveauxb P. y Porporatob P.E. 2010. NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species production activates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) via the ERK pathway after hyperthermia treatment. Proc Natl Acad Sci USA 107: 20477-20482.

Morikawaa T., Kajimuraa M. y Nakamura T. 2012. Hypoxic regulation of the cerebral microcirculation is mediated by a carbon monoxide-sensitive hydrogen sulfide pathway. Proc Natl Acad Sci USA 109:1293-1298.

Murphy M.P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J 417:1–13.

Nappi A.J., Vass E.y Iron, 2000. Metalloenzymes and cytotoxic reactions. Cell Mol Biol 46: 637-47.

Nicolet B.H. 1930. The structure of glutathione. Sci. 71, 589-590.

Nicholls D.G. 2009. Mitochondrial calcium function and dysfunction in the central nervous system. Biochim Biophys Acta 1787: 1416-1424.

Nicholls D.G. y Budd S.L. 1998. Mitochondria and neuronal glutamate

excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1366: 97-112.

Nicotera P., Leist M. y Manzo L. 1999. Neuronal cell death: a demise with different shapes. *Trends Pharmacol Sci* 20: 46-51.

Ndubuizu O. y LaManna J.C. 2007. Brain tissue oxygen concentration measurements. *Antioxid Redox Signal* 9: 1207–1219.

Nguyen A., Cherry B.H. y Scott G.F. 2014. Erythropoietin: Powerful protection of ischemic and post-ischemic brain.

Noguchi C.T., Asavaritikrai P., Teng R. y Jia Y. 2007. Role of erythropoietin in the brain. *Crit Rev Oncol/hematol* 64:159-171.

Oh S.M. y Betz L. 1991. Interaction between free radicals and excitatory amino acids in the formation of ischemic brain edema in rats. *Stroke* 22: 915-921.

Orrenius S., Zhivotovsky N. y Nicotera P. 2003. Regulation of cell death: the calcium apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:552-565).

Ott M., Gogvadze V., Orrenius S. y Zhivotovsky B. 2007. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12:913–922.

Palmer C., Vannucci R.C. y Towfighi J. 1990. Reduction of perinatal hypoxic-ischemic brain damage with allopurinol. *Pediatr Res* 27:332–336.

Pamplona R. y Barja G. 2007. Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Res Rev* 6:189–210.

Peeringen P., Gwinn R. y Simon R.P. 1996. The effects in vivo of hypoxia on brain injury. *Brain research*, vol. 725, no. 2, pp. 184-191.

Pelligrini-Giampietro D.E., Cherici G., Alesiani M., Carla V. y Moroni F. 1990. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 10: 1035-1041.

Perry J.J., Shin D.S., Getzoff E.D. y Trainer J.A. 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1804, 245-262.

Phelps C.H. 1972. Barbiturate-induced glycogen accumulation in brain: an electron microscopic study. *Brain Res* 39:225–234.

Pizza M., Goffi F., Boroni F., Benarese M., Perkins S.E., Liou H.C. y Spano P.F. 2002. Opposing roles for NF- κ B/Rel factors p65 and c-Rel in the modulation of neuron survival elicited by glutamate and interleukin-1 β . *J Biol Chem* 277:20717–20723.

Plumier J.C., Krueger A.M., Currie R.W., Kontoyiannis D., Kollias G. y Pagoulatos G.N. 1997. Transgenic mice expressing the human inducible HSP70 have hippo-campal neurons resistant to ischemic injury. *Cell stress & chaperones*, vol. 2, no. 3, pp. 162.

Powell F.L., García N. 2000. Physiological effects of intermittent hypoxia. *High Alt Med Biol* 1:125-136.

Prabhakar N.R. y Semenza G.L. 2015. Oxygen sensing and homeostasis. *Physiology* 30: 340-348.

Priestley J. 2010. *Experiments and Observations on different kinds of air.* Paperback book edition. 2nd ed. London: J. Johnson 1775 -1777. Vol. 1 – 3.

Prins M.L. 2008. Cerebral metabolic adaptation and ketone metabolism after brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:1–16.

Pugh C.W. y Ratcliffe P.J. 2003. Regulation of angiogenesis by hypoxia: the role of the HIF system. *Nat Med* 9:677-684.

Qutub A.A. y Popel A.S. 2008. Reactive oxygen species regulate hypoxia-inducible factor 1 α differentially in cancer and ischemia. *Mol Cell Biol* 28:5106-5119.

Rabie T. y Marti H.H. 2008. Brain protection by erythropoietin: A manifold task. *Physiology* 23: 263-274.

Radi E., Formichi, Battisti C. y Federico A. 2014. Apoptosis and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis* 42 Suppl 3:S125-152.

Raichle M.E. 2015. The restless brain: how intrinsic activity organizes brain function. *Phil Trans R Soc B*:370:20140172.

Rahn H. y Otis A.B. 1949. Man's respiratory response during and after acclimatization to high altitude. *Am J Physiol* 157: 445-462.

Raichle M.E. y Mintun M.A. 2006. Brain work and brain imaging. *Annu Rev Neurosci* 29: 449-476.

Ratcliffe P.J., O'Rourke J.F., Maxwell P.H. y Pugh C.W. 1998. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J Exp Biol* 201: 1153-1162.

Rauca C., Zerbe R., Jantze H. y Drug M. 2000. The importance of free hydroxyl radicals to hypoxia preconditioning. *Brain Res* 868:147-149.

Rey S. y Semenza G.L. 2010. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodeling. *Cardiovasc Res* 86:236-242.

Ricard-Jané D.L.M. y Lopez-Tejero X. 2002. Anticoagulants and other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantifications by the Griess

method. Nitric Oxide.6:178–185.

Ridder D.A. y Schwaninger M. 2009. NF- κ B signaling in cerebral ischemia. *Neurosci* 158:995-1006.

Roberts R.A., Laskin, D. y Smith C.V. 2009. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicol Sci* 112: 4-16.

Rodriguez F., Casas H., Casas M., Pagés T. y Rama R. 1999. Intermittent hypobaric hypoxia stimulates erythropoiesis and improves aerobic capacity. *Med Sci Sports Exerc* 31:264-268.

Rodriguez-Rodriguez P., Fernandez E. y Bolaños J.P. 2013. Underestimation of the pentose-phosphate pathway in intact primary neurons as revealed by metabolic flux analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 33: 1843-1845.

Rolett E.L., Azzawi A., Liu K.J., Yongbi M.N., Swartz H.M. y Dunn J.F. 2000. Critical oxygen tension in rat brain: a combined P-31-NMR and EPR oximetry study. *Am J Physiol* 279:R9-R16.

Rolfe D.F. y Brown G.C. 1997. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol. Rev.* 77: 731–758.

Rothman S.M. y Olney J.W. 1986. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 19: 105-111.

Roy C.S. y Sherrington C.S. 1890. On the regulation of the blood-supply of the brain. *J Physiol* 11:85–158.17.

Ruscher K., Freyer D. y Karsch M. 2002. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: Evidence from an in vitro model. *J Neurosci*; 22: 10291-10301.

Sakamoto A., Ohnishi S.T., Ohnishi T. y Ogawa R. 1991. Relationship between

free radical production and lipid peroxidation during ischemia-reperfusion injury in the rat brain. *Brain Res* 554: 186-192.

Sakanaka M., Wen T.C. y Matsuda S. 1998. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci USA*; 95: 4635-4640.

Sanderson T.H., Reynolds C.A. y Kumar R. 2013. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: Pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Mol Neurosci* 47:9-23.

Sarnico I., Lanzillota A., Benarese M., Alghisi M., Baiguera C., Battistin L., Spano P. y Pizzi M. 2009. NF-kappaB dimmers in the regulation of neuronal survival. *Int Rev Neurobiol* 85:351-362.

Sasaki H., Ochi N., Dell A. y Fukuda M. 1988. Site-specific glycosylation of human recombinant erythropoietin: analysis of glycopeptides or peptides at each glycosylation site by fast atom bombardment mass-spectrometry. *Biochemistry* 1988; 27: 8618-8626.

Sattler R. y Tymianski M. 2000. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *J Mol Med* 78: 3-13.

Sattler R., Xiong Z., Lu W.Y., MacDonald J.F. y Tymianski M. 2000. Distinct roles of synaptic and extrasynaptic NMDA receptors in excitotoxicity. *J Neurosci* 20: 22-23

Schellenberg B., Wang P. y Keeble J.A. 2013. Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming. *Mol Cell* 49:959-971.

Schild L. y Reiser G. 2005. Oxidative stress is involved in the permeabilization of the inner membrane of brain mitochondria exposed to hypoxia/reoxygenation and low micromolar Ca²⁺. *FEBS J* 272:3593-3601.

Schulz G.E., Schirmer R.H., Sachsenheimer W. y Pai E.F. 1978. The structure of the flavoenzyme glutathione reductase. *Nature*. 273, 120-124.

Semenza G.L. 2012. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148: 399-408.

Semenza G.L. 2009. Regulating of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology* 24:97-106.

Semenza G.L. 2001. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 13: 167-171.

Semenza G.L. 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev* 8: 588-594.

Semenza G.L., Roth P.H., Fang H.M. y Wang G.L. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 269: 23757-23763.

Semenza G.L. y Wang G.L. 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12: 5447-5454.

Semenza G.L., Neufelt M.K., Chi S.M. y Antonarakis S.E. 1991. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5680-5684.

Severinghaus J.W. 2003. Fire-air and dephlogistication. Revisionisms of oxygen's discovery. *Adv Exp Med Biol* 543: 7-19.

Sharp F.R. y Bernaudin M. 2004. HIFI and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosc* 5: 437-448.

Shinder A.F., Olson E.C., Spitzer N.C. y Montal M. 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 16: 6125-6133.

Sies H. 1986. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem.* 98, 1061-1078.

Siesjo B.K., Zhao Q., Pahlmark K., Siesjo .P, Katsura K. y Folbergrova J. 1995. Glutamate, calcium and free radicals as mediators of ischemic brain damage. *Ann Thorac Surg* 59: 1316-1320.

Silver I. y Erecinska M. 1998. Oxygen and ion concentration in normoxic and hypoxic brain cells. *Adv Exp Med Biol* 454: 7-16.

Silver I.A., Deas J. y Erecinska M. 1997. Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *J Neurosci* 78:589-602.

Singh S., Vats P. y Kumiria M. 2001. Effect of high altitude (7620 m) exposure on glutathione and related metabolism in rats. *Eur J Appl Physiol* 84:233-237.

Sirén A.L., Fratelli M. y Brines 2001. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4044-4049.

Somers V.K., Dyken M.E., Clary M. y Abboud F.M. 1995. Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep-apnea. *J. Clin Invest* 96:1897-1904.

Spivak J.L. y Hogans B.B. 1989. The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood* 73: 90-99.

Sreedhar A.S. y Csermely P. 2004, Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacology & therapeutics*, vol. 101, no. 3, pp. 227-257.

Staniek K. y Nohl N. 2000. Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta* 1460: 268–275.

Stout A.K., Raphael H.M. y Kanterewicz E. 1998. Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nat Neurosci* 1:366-373.

St-Peirre J. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277: 44784–44790.

Stralin P., Karlsson K., Johansson B.O. y Marklund S.L. 1995. The interstitium of the human arterial wall contains very large amounts of extracellular superoxide dismutase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 15, 2032-2036.

Szydłowska K y, Timiansky M. 2010. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47: 122-129.

Tan C.C., Eckardt K.U., Firth J.D. y Ratcliffe P.J. 1992. Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol* 263:F474-F481.

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

Todt F., Cakir Z. y Reichenbach F. 2015. Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak. *EMBO J* 2015, 34:67-80.

Tu W., Xu X. y Peng L. 2010. DAPK1 interaction with NMDA receptor NR2B subunits mediates brain damage in stroke. *Cell* 140: 222-234.

Turrens J. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552: 335-44.

Uchida E., Morimoto K., Kawasaki N., Izaki Y., Said A.A. y Hayakawa T. 1997. Effect of active oxygen radicals on protein and carbohydrate moieties of recombinant human erythropoietin. *Free Radic Res* 27: 311-323.

Uchiyama M. y Mihara M. 1978. Determination of Malonaldehyde Precursor in Tissues by Thiobarbituric Acid Test, *Analytical Biochemistry*, 86: 1, 271-278.

Ünal-Çevik I., Kiliç M., Can A., Gürsoy-Ózdemi y, Dalkara T. 2004. Apoptotic and necrotic death mechanisms are concomitantly activated in the same cell after cerebral ischemia. *Stroke* 35: 2189-2194.

Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M. y Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiology and human disease. *Int J Bioche Cell Biol* 39:44-84.

Valentim L.M., Rodnight R., Geyer A.B., Horn A.P., Tavares A., Cimarosti H., Netto, C.A. y Salbego C.G. 2003. Changes in heat shock protein 27 phosphorylation and immunoccontent in response to preconditioning to oxygen and glucose deprivation in organotypic hippocampal cultures. *Neuroscience*, vol. 118, no. 2, pp. 379-386.

Vander Heiden M.G. y Thompson C.B. 1999. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* 1: E209-E16.

Viault F. 1890. Sur l'augmentation considérable du nombre des globules rouge dans le sang chez Les inhabitants des hauts plateaux de l'Amérique du Sud. *C. R. Acad. Sci. Paris* 111: 917-918.

Vovenko E. 1999. Distribution of oxygen tension on the surface of arterioles, capillaries and venules of brain cortex and in tissue in normoxia: an experimental study on rats. *Pflugers Arch* 437: 617-623.

Walder C.E., Green S.P., Darbonne W.C., Mathias J., Rae J., Dinauer M.C., Cur-nutte J.T. y Thomas G.R. 1997. Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a

functional NADPH oxidase. *Stroke* 28:2252–2258.

Wang G.L. y Semenza G.L. 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem* 270: 1230-1237.

Wang X., Michaelis E.K. 2010. Selective Neuronal Vulnerability to Oxidative Stress in the Brain. *Front Aging Neurosci.* 2: 12.

Wang X. 2015. The expanding role of mitochondria in apoptosis. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 15(22):2922-33

Waxman E.A. y Linch D.R. 2005. N-methyl-D-aspartic receptor subtypes : multiple role in excitotoxicity and neurological disease. *Neuroscientist* 11: 37-49.

Wei M.C., Zong W.X. y Cheng E.H. 2001. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292:727-30.

Wen T.C., Sadamoto Y. y Tanaka J. 2002. Erythropoietin protects neuron against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xl expression. *J Neurosci Res* 67: 795-803.

Wenger R.H., Stiehl D.P. y Camenisch G. 2005. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci. STKE* 306:1–13.

Wilber R.L. 2007. Application of altitude/hypoxia training by elite athletes. *Med Sci Sports Exerc* 39:1610-1624.

Williams M.D., Van Remmen H. y Conrad C.C 1998. Increased oxidative damage is correlated to altered mitochondrial dysfunction in heterozygous manganese superoxide dismutase knockout mice. *J Biol Chem* 273:28510-28515.

Willis S. y Adams J.M. 2005. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17:617-625.

Wilson D.F., Owen C.S. y Erecinska M. 1979. Quantitative dependence of mitochondrial oxidative phosphorylation on oxygen concentration: a mathematical model. *Arch Biochem Biophys* 195: 494–504.

Wojchowski D.M., Gregory R.C., Miller C.P., Pandit A.K. y Pircher T.J. 1999. Signal transduction in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res* 199; 253: 143-56.

Wyllie A.H. 2010. Where, o death, is thy sting? A brief review of apoptosis biology. *Mol Neurobiol* 42:4-9.

Youle R.J. y Strasser A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:47-59.

Zauner A., Daugherty W.P., Bullock y Warner D.S. 2002. Brain oxygenation and energy metabolism. *Neurosurgery* 51: 289-301.