



Instituto de Biomedicina de Sevilla
Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

TESIS DOCTORAL

Activación de las células glómicas por hipoxia y lactato.
El cuerpo carotídeo como sensor metabólico.

Hortensia Torres Torrelo
Sevilla, 2018

El Dr. José López Barneo, Catedrático, y la Dra. Patricia Ortega Sáenz, Profesora Titular, ambos del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN:

que la presente Tesis Doctoral titulada “Activación de las células glómicas por hipoxia y lactato. El cuerpo carotídeo como sensor metabólico”, presentada por la doctoranda Hortensia Torres Torrelo, licenciada en Biología, ha sido realizada bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctora por la Universidad de Sevilla.

Sevilla, 3 de octubre 2018.

Fdo. Dr. José López Barneo

Fdo. Dra. Patricia Ortega Sáenz

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en las revistas científicas que se indica más abajo. Como los textos originales no se han utilizado de forma literal, no se ha considerado necesario solicitar permiso para reproducirlos traducidos al español.

Artículos científicos publicados:

Arias-Mayenco I, González-Rodríguez P, Torres-Torrelo H, Gao L, Fernández-Agüera MC, Bonilla-Henao V, Ortega-Sáenz P & López-Barneo J. (2018). Acute O₂ sensing: role of coenzyme QH₂/Q ratio and mitochondrial ROS compartmentalization. *Cell Metab* 28, 145-158.

Torres-Torrelo H, Ortega-Sáenz P, Macías D, Omura M, Zhou T, Matsunami H, Johnson RS, Mombaerts P & López-Barneo J. (2018). The role of Olf78 in the breathing circuit of mice. *Nature* 561, 33-40.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de Tesis los Drs. José López Barneo y Patricia Ortega Sáenz, su enseñanzas, su apoyo y dedicación en este proyecto. El trabajo que se describe, realizado con metodologías muy diferentes, ha sido posible gracias a la participación fundamental de Ignacio Arias Mayenco y Lin Gao. Agradecer también a todo mi grupo de investigación “El laboratorio 101” del IBIS. Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a una beca predoctoral del programa FPI del Ministerio de economía y competitividad, a ayudas del Plan Nacional al grupo de investigación y a un proyecto europeo ERC.

AGRADECIMIENTOS.

Quiero dar las gracias en primer lugar a mis directores de Tesis. Pepe, cuando era una niña soñaba con trabajar contigo y la realidad ha superado los sueños...ha sido un autentico placer, eres un ejemplo de liderazgo, trabajo y audacia, soy consciente de la suerte que tengo de ser tu pupila. Creo que te doy las gracias en nombre de toda mi generación por el IBIS y por hacer de esta vocación una opción. Gracias a mi Jefa, que ha sido madre, compañera, amiga y guía en este caminito tan lleno de piedrecitas, muchas gracias por ser un faro en momentos difíciles. Siempre te digo que no sabes la suerte que tienes de tenerme de becaria pero la verdadera afortunada he sido yo de tenerte a ti de jefa. He aprendido de la mejor. Gracias por regalarnos esa sonrisa diaria a pesar de que no todo siempre haya ido bien. Gracias a los dos por acogerme en la casa y confiar en mi sin conocerme de nada!

Gracias a mi laboratorio, vosotros hacéis del trabajo un hogar para mi. Gracias por tratarme siempre con tanto amor y cariño. Me encanta ser “la niña”. Gracias a mis chicas, mi amigas, “Chacinas de Fuente de”, gracias por esos cafés y tostadas de jamón, por las cenitas, por todos los consejos y sobre todo gracias porque se que puedo contar con vosotras...Gracias a mi Nacho, mi compañero de fatigas, los largos días de registros han sido más llevaderos porque estábamos juntos escuchando extremoduro. Gracias amigo, te deseo toda la suerte del mundo en tu nuevo camino.

Gracias a mi familia, yo soy quien soy por vosotros. Papa, que afortunada soy de ser tu hija, es muy fácil hacer las cosas bien teniéndote como ejemplo y como consejero. Siempre has creído en mi. Cuando me dices “esta niña no tiene abuelas” yo pienso, tengo abuelas y un padre que me dice todo los días lo maravillosa que soy, como no voy a tener el autoestima alta. Mamita, gracias por ese amor tan incondicional, no se como lo consigues pero un abrazo tuyo y todas las preocupaciones de la vida se van sin más, tu eres casa y contigo nada malo puede pasar. Gracias a mi sobrino, mi vikingo, has llenado mi vida de magia, que maravilla verte crecer. Gracias a mis hermanos, los mejores amigos que nadie pueda tener. Julio, mi hermano mayor, la persona más buena e impecable que conozco, siempre me has dejado el listón alto hermanito. A mi hermana de mi alma, mi persona preferida del mundo, brillas con luz propia, estoy muy orgullosa de ti bebe. Estoy súper orgullosa de los dos. Gracias a mi compañerito fiel, mi Clipper. Gracias también a mis cuñaos... sois los más mejores.

Gracias a mi chicas, las de siempre, y a mi Bakero, los testigos de mi vida, gracias por recordarme quien soy y no dejarme perder el Sur. Gracias a mi madriguera, a mi gente, sin esos miércoles de entreno no hubiera sobrevivido en esta dura etapa de mi vida.

Gracias a la voz de las montañas que me han susurrado el camino cuando ya parecía que nada tenía sentido.

Y gracias a mi Pepa, que hubiera sido de mi sin ti! Muchas gracias por cruzarte en mi caminito y enseñarme que si lo creo se crea.

Gracias a todos.

A mi familia,

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Sistema homeostático sensor agudo de oxígeno.....	3
2. Fisiología del cuerpo carotídeo.....	4
2.1. Aspectos generales sobre la estructura y función del cuerpo carotídeo.....	4
2.2. Modelo de membrana de quimiotransducción.....	6
3. Hipótesis actuales sobre el “sensor de oxígeno” del cuerpo carotídeo.....	8
3.1 Hipótesis mitocondrial.....	8
3.2. El receptor Olf78 como sensor de hipoxia del cuerpo carotídeo.....	16
3.2.1. Receptor Olf78 e hipoxia.....	16
3.2.2. Receptor Olf78 y lactato.....	17
4. Metabolismo del lactato; importancia biológica.....	18
4.1. Producción y función de lactato.....	18
4.2. Lactato y regulación de la respiración.....	22
4.2.1. Lactato e hipoxia.....	22
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. Generación, mantenimiento y manipulación de los animales de experimentación.....	31
1.1. Generación de los diferentes modelos de ratón <i>knockout</i> : TH-NDUFS2, ESR-NDUFS2 y Olf78.....	31
1.2. Mantenimiento y tratamiento de los modelos de ratones <i>knockout</i>	32
1.3. Experimentos realizados en animales <i>in vivo</i>	33
1.3.1. Medida de la concentración de lactato en sangre.....	33
1.3.2. Medida de la función respiratoria mediante pletismografía.....	33
2. Preparaciones celulares.....	36
2.1. Rodajas de cuerpo carotídeo.....	36
2.2. Células dispersas de cuerpo carotídeo.....	36
3. Técnicas bioquímicas y de biología molecular <i>in vitro</i>	37
3.1. Medición de la actividad del complejo I mitocondrial.....	37
3.2. PCR estándar.....	37
3.3. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa.....	39
4. Inmunohistoquímica de fluorescencia en rodajas de cuerpo carotídeo.....	39
5. Experimentos funcionales <i>in vitro</i>	40
5.1. Técnicas electrofisiológicas.....	40
5.1.1. Técnica de amperometría.....	40
5.1.2. Técnica de <i>patch-clamp</i>	43
5.2. Técnicas microfluorimétricas.....	46
5.2.1. Equipamiento de registro microfluorimétrico.....	46

5.2.2. Medida de cambios en la concentración citosólica de distintas especies.....	48
6. Soluciones de registro.....	50
7. Análisis estadístico de los datos.....	52
RESULTADOS.....	53
1. Inhibición de la respuesta aguda a hipoxia en quimiorreceptores arteriales periféricos tras la ablación inducible del gen <i>Ndufs2</i> en ratones adultos.....	55
1.1. Ratones ESR-NDUFS2. Tratamiento y evolución de la línea.....	55
1.2. Pérdida gradual, sistémica y celular, de la respuesta a hipoxia en paralelo con la inhibición de la función del complejo mitocondrial I en ratones ESR-NDUFS2.....	55
1.2.1. Análisis de la función del complejo mitocondrial I.....	56
1.2.2. Respuesta ventilatoria a hipoxia.....	57
1.2.3. Propiedades funcionales de las células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2.....	57
1.2.3.1. Respuesta secretora a hipoxia en rodajas de cuerpo carotideo.....	57
1.2.3.2. Cambios en la concentración de calcio intracelular.....	60
1.2.3.3. Caracterización electrofisiológica de las células glómicas del modelo de ratón ESR-NDUFS2.....	60
1.3. La deficiencia inducida de <i>Ndufs2</i> inhibe la señalización del complejo mitocondrial I durante hipoxia en las células glómicas del cuerpo carotideo.....	63
1.3.1. Incremento de NADH durante hipoxia en el complejo mitocondrial I.....	65
1.3.2. Efecto de la regeneración de NAD ⁺ sobre la respuesta a hipoxia aguda.....	68
1.3.2.1. Tratamiento agudo con regeneradores de NAD ⁺	68
1.3.2.2. Tratamiento crónico con regeneradores de NAD ⁺ en células controles.....	70
1.3.2.3. Tratamiento crónico con regeneradores de NAD ⁺ en células ESR-NDUFS2.....	73
1.3.3. Incremento de los niveles de ROS en el espacio intermembrana durante hipoxia.....	76
1.3.3.1. Estado de oxidación basal en las células glómicas de ratones ESR-NDUFS2.....	76
1.3.3.2. Incremento de ROS de espacio intermembrana durante hipoxia.....	77
1.3.3.3. Efecto del H ₂ O ₂ sobre los parámetros electrofisiológicos de las células glómica.....	79
1.4. La modulación de la actividad de la succinato deshidrogenasa (MCII) afecta a la respuesta aguda a hipoxia de células glómicas de cuerpo carotideo.....	80

2. Papel de receptor olfatorio atípico Olfr78 en la respuesta aguda a la hipoxia en los quimiorreceptores arteriales.....	83
2.1. Estudio de los ratones Olfr78. Tratamiento y evolución de la línea.....	83
2.2. Validación del modelo Olfr78.....	84
2.3. Respuesta a hipoxia en ratones Olfr78.....	86
2.3.1. Respuesta ventilatoria a hipoxia aguda.....	86
2.3.2. Respuesta a hipoxia en las células glómicas de ratones Olfr78....	89
2.3.2.1. Respuesta secretora a hipoxia en rodajas de cuerpo carotídeo.....	89
2.3.2.2. Cambios en la concentración de calcio intracelular en respuesta a hipoxia.....	89
2.4. Respuesta a lactato en las células glómicas del cuerpo carotídeo de ratones Olfr78.....	91
2.4.1. Respuesta secretora a lactato en rodajas de cuerpo carotideo.....	91
2.4.2. Incremento de calcio intracelular en respuesta a lactato en células glómicas de ratones Olfr78.....	91
3. Estimulación de las células glómicas por lactato.....	92
3.1. Incremento de la concentración de lactato en sangre en respuesta a hipoxia aguda.....	93
3.2. Activación de las células glómicas por lactato.....	94
3.2.1. Efectos del lactato sobre el potencial de membrana y las corrientes de potasio de las células glómicas.....	97
3.3. Mecanismos moleculares involucrados en la activación por lactato en las células glómicas.....	98
3.3.1. Efecto del lactato sobre el pH intra y extracelular.....	99
3.3.2. Incremento de NADH intracelular inducido por lactato.....	100
3.4. La modulación del ratio NADH/NAD ⁺ afecta a la respuesta a lactato de células glómicas de cuerpo carotideo.....	102
3.4.1. Efecto de la regeneración de NAD ⁺ en la respuesta a lactato.....	102
3.4.2. Efecto sumatorio de la hipoxia y el lactato sobre la actividad de las células glómicas.....	104
DISCUSIÓN.....	107
1. Modelo de señalización mitocondrial dependiente del CMI en respuesta a hipoxia aguda.....	109
1.1. La activación del cuerpo carotídeo en respuesta a hipoxia depende del CMI.....	109
1.2. NADH y ROS, moléculas señalizadoras en respuesta a hipoxia.....	111
1.3. Respuesta a hipoxia con regeneración química de NAD ⁺	114
1.4. Ratio CoQH ₂ /CoQH y respuesta aguda a hipoxia en las células glómicas.....	115
2. Papel del receptor Olfr78 en la respuesta aguda a la hipoxia.....	117

3. Metabolismo sistémico del lactato; importancia biológica y detección por el cuerpo carotídeo.....	119
CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFÍA	129

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Estructura y organización del cuerpo carotídeo.....	6
Figura 2. Respuesta a hipoxia aguda en células glómicas.....	7
Figura 3. Efecto de los inhibidores mitocondriales sobre la respuesta a hipoxia de las células glómicas.....	10
Figura 4. Análisis de la expresión de Ndufs2 en tejidos catecolaminérgicos del sistema nervioso periférico de ratones TH-NDUFS2.....	11
Figura 5. Abolición de la respuesta ventilatoria a hipoxia en ratones TH-NDUFS2.....	11
Figura 6. Abolición de la respuesta a hipoxia en células glómicas de ratones TH-NDUFS2.....	12
Figura 7. Abolición de la inhibición por hipoxia de los canales de potasio en células glómicas de ratones TH-NDUFS2.....	13
Figura 8. Abolición del incremento de las moléculas señalizadoras (NADH y ROS) en células glómicas de ratones TH-NDUFS2 durante hipoxia.....	14
Figura 9. Modelo de sensibilidad a la hipoxia aguda en los quimiorreceptores arteriales.....	15
Figura 10. Pérdida selectiva de la respuesta a hipoxia en animales completos Olfr78.....	17
Figura 11. Pérdida de la respuesta a hipoxia en el nervio del seno de cuerpo carotídeo de ratones Olfr78.....	17
Figura 12. El lactato activa el receptor Olfr78 durante hipoxia.....	18
Figura 13. Metabolismo de lactato.....	21
Figura 14. Tratamiento de los ratones ESR-NDUFS2.....	32
Figura 15. Diseño experimental de la medida de la concentración de lactato en sangre.....	33
Figura 16. Equipamiento de pletismografía.....	34
Figura 17. Incremento de la frecuencia respiratoria de un animal control en respuesta a hipoxia e hipercapnia.....	35
Figura 18. Equipamiento de amperometría.....	42
Figura 19. Actividad secretora típica de una célula de cuerpo carotídeo ante un estímulo hipóxico.....	43
Figura 20. Equipamiento de <i>patch-clamp</i>	44
Figura 21. Equipamiento de microfluorimetría.....	47
Figura 22. Pérdida de la actividad del CMI tras el tratamiento con TMX en ratones ESR-NDUFS2.....	56
Figura 23. Curso temporal de la pérdida de la respuesta ventilatoria a hipoxia en ratones ESR-NDUFS2.....	58
Figura 24. Respuesta secretora a hipoxia, hipercapnia y alto potasio de las células glómicas en rodajas de cuerpo carotídeo de ratones controles y ESR-NDUFS2.....	59

Figura 25. Pérdida del incremento de calcio intracelular en células glómicas de ratones ESR-NDUFS2.....	61
Figura 26. Propiedades electrofisiológicas de las células glómicas controles y ESR-NDUFS2.....	62
Figura 27. Corrientes de Ca ²⁺ y K ⁺ voltaje-dependientes de las células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2.....	64
Figura 28. La deficiencia inducida de <i>Ndufs2</i> inhibe la señalización del MCI durante la hipoxia aguda.....	66
Figura 29. Inhibición de la acumulación de NADH inducido por rotenona en células con déficit inducido de <i>Ndufs2</i>	67
Figura 30. Respuesta gradual de NADH a distintos niveles de presión de oxígeno.....	67
Figura 31. Agentes regeneradores de NAD ⁺	68
Figura 32. Regeneración aguda de NAD ⁺ y capacidad de respuesta a la hipoxia de las células glómicas de ratones controles y deficientes en <i>Ndufs2</i>	69
Figura 33. Mantenimiento del incremento de NADH en respuesta a hipoxia en células glómicas del cuerpo carotídeo de ratones controles incubadas crónicamente con regeneradores de electrones (NAD ⁺).....	71
Figura 34. Propiedades electrofisiológicas de las células glómicas controles tratadas crónicamente con α KB.....	72
Figura 35. Corrientes de Ca ²⁺ y K ⁺ voltaje-dependientes de las células glómicas controles y tratadas con 2,5 mM α KB crónicamente.....	73
Figura 36. La pérdida de la respuesta a hipoxia, medida con NAD(P)H, en las células glómicas ESR-NDUFS2 no es recuperada por los regeneradores de aceptores de electrones NAD ⁺	74
Figura 37. El dimetil succinato (DMSuc), sustrato del CMII, favorece la activación de la cadena de transporte de electrones mitocondrial.....	75
Figura 38. La pérdida de la respuesta a hipoxia, medida con FURA, en las células glómicas deficiente en <i>Ndufs2</i> no es recuperada por los regeneradores de aceptores de electrones NAD ⁺ y la incubación con DMSuc.....	76
Figura 39. Nivel de oxidación basal de las células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2.....	77
Figura 40. El déficit inducido de <i>Ndufs2</i> inhibe la señalización de ROS del complejo mitocondrial I durante hipoxia en las células glómicas del cuerpo carotídeo.....	78
Figura 41. Modulación por DMM de las respuestas celulares a la hipoxia.....	81
Figura 42. Activación de la CTE por DMSuc.....	82
Figura 43. Genotipo de los modelos animales <i>Olf78</i> (FRA y JAX).....	84
Figura 44. Ausencia de ARNm <i>Olf78</i> en los ratones <i>knockout</i> <i>Olf78</i> -FRA.....	85
Figura 45. Detección inmunohistoquímica de proteína fluorescente verde (GFP) y tirosina hidroxilasa (TH) en rodajas de cuerpo carotídeo.....	85
Figura 46. Respuesta ventilatoria a hipoxia e hipercapnia de ratones controles y deficientes para <i>Olf78</i> (FRA).....	86

Figura 47. Análisis de la respuesta ventilatoria de ratones controles y Olfr78 FRA.....	87
Figura 48. Análisis de la respuesta ventilatoria de ratones controles y Olfr78 JAX.....	88
Figura 49. Respuestas secretoras a la hipoxia en células glómicas de ratones Olfr78.....	90
Figura 50. Aumento de la concentración de Ca ²⁺ intracelular de las células glómicas de ratones controles y Olfr78 en respuesta a hipoxia.....	90
Figura 51. Respuesta secretora de las células glómicas de ratones controles y Olfr78 (FRA) a 5 mM lactato.....	91
Figura 52. Aumento de la concentración de Ca ²⁺ intracelular de las células glómicas de ratones controles y Olfr78 en respuesta a 5mM lactato.....	92
Figura 53. Niveles de lactato en sangre en función de la presión parcial de oxígeno en el aire inspirado.....	93
Figura 54. Las células del cuerpo carotideo (registradas en rodajas de tejido) son activadas por un incremento de lactato extracelular.....	94
Figura 55. Respuesta secretora inducida por distintas concentraciones de lactato extracelular de células glómicas en rodajas cuerpo carotideo.....	95
Figura 56. Las células glómicas aisladas son activadas por un incremento de lactato extracelular.....	96
Figura 57. Dependencia de calcio extracelular para la activación por lactato de las células glómicas.....	97
Figura 58. El lactato induce una despolarización del potencial de membrana en las células glómicas.....	98
Figura 59. Caracterización electrofisiológica de la respuesta a lactato.....	99
Figura 60. El incremento de lactato no modifica el pH intracelular ni extracelular en células glómicas del CC.....	100
Figura 61. Incremento de NADH en respuesta a lactato.....	101
Figura 62. Respuesta gradual de NADH a diferentes concentraciones de lactato.....	101
Figura 63. Inhibición de la respuesta a lactato por piruvato.....	103
Figura 64. Activación de las células glómicas por piruvato.....	104
Figura 65. Potenciación de la respuesta a lactato de NADH por hipoxia.....	105
Figura 66. Potenciación de la respuesta secretora a hipoxia por lactato.....	106
Figura 67. Modelo de la sensibilidad a hipoxia aguda en la CTE de las células glómicas del cuerpo carotideo.....	113
Figura 68. Modelo del CMI como señalizador de la respuesta a hipoxia en el cuerpo carotideo	117
Figura 69. Efecto sumatorio de lactato e hipoxia en las células quimiosensitivas del cuerpo carotideo.....	122

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de los cebadores empleados para el genotipado de los ratones por PCR.....	39
Tabla 2. Soluciones y mezclas de gases de registro.....	51
Tabla 3A. Composición de la solución interna para registro de <i>patch-clamp</i> en células glómicas dispersas de cuerpo carotídeo.....	51
Tabla 3B. Composición de la solución externa para registro de <i>patch-clamp</i> en células glómicas dispersas de cuerpo carotídeo	52
Tabla 4. Propiedades electrofisiológicas de las células glómicas controles y ESR-NDUFS2.....	62
Tabla 5. Propiedades electrofisiológicas de las células glómicas controles y las células dializadas con H ₂ O ₂	79
Tabla 6. Propiedades electrofisiológicas de las células glómicas controles y las células dializadas con succinato.....	82

ABREVIATURAS

2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)Carboxyfluorescein Acetoxymethyl Ester (**BCECF-AM**)

Cadena de transporte de electrones (**CTE**)

Complejo mitocondrial I, II, III (**CMI, CMII, CMIII**)

Complejo mitocondrial IV o citocromo c oxidasa (**CMIV**)

Cuerpo carotídeo (**CC**)

Dimetil-malonato (**DMM**)

Dimetil-succinato (**DMSuc**)

Especie reactivas de oxígeno (**ROS**)

Fura-2 acetoxymethyl Ester (**FURA-2AM**)

Ganglio cervical superior (**GCS**)

Hypoxia inducible factors, (**HIFs**)

Knockout (**KO**)

Lactato deshidrogenasa (**LDH**)

Médula adrenal (**MA**)

Presión arterial de dióxido de carbono (**PaCO₂**)

Presión arterial de oxígeno (**PaO₂**)

Presión parcial de oxígeno (**PO₂**)

Quinona (**CoQ**)

Quinona reducida (**CoQH₂**)

Reduction-oxidation sensitive green fluorescent protein (**roGFP**)

Respuesta ventilatoria a hipoxia (**RVH**)

ROS en el espacio intermembrana (**ROS-EIM**)

Sistema nervioso periférico (**SNP**)

Tamoxifeno (**TMX**)

Tirosina hidroxilasa (**TH**)

Transportadores monocarboxílicos de lactato/ piruvato (**MCT**)

Vasoconstricción pulmonar hipóxica (**VPH**)

α -cetobutirato (**α KB**)

α -hidroxibutirato (**α HB**)

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El oxígeno (O_2) es un elemento esencial para la vida de los organismos que usan el metabolismo celular aeróbico como fuente de energía. Actúa como aceptor final de electrones en la cadena de transporte de electrones (CTE), haciendo posible la síntesis de adenosín trifosfato (ATP) mediante la fosforilación oxidativa en la mitocondria.

La falta de O_2 (hipoxia), aunque sea de manera focalizada y transitoria, puede dañar gravemente los tejidos. Por este motivo, el organismo dispone de mecanismos encargados de detectar la deficiencia de O_2 y generar respuestas adaptativas para disminuir los efectos deletéreos de la hipoxia. Existen dos tipos de respuesta adaptativas a hipoxia según el tiempo de exposición a una disminución de O_2 : aguda y crónica (López-Barneo *et al.*, 2001). Cuando la hipoxia se produce de manera puntual y aguda, o durante los primeros minutos de exposición a una hipoxia prolongada, se activan una serie de mecanismos de adaptación rápidos. Estos mecanismos incluyen reflejos respiratorios y cardiovasculares, como la hiperventilación y la activación simpática que, en pocos segundos, incrementan la captación de O_2 y aceleran su distribución a los tejidos a través del sistema circulatorio, especialmente al cerebro y corazón. Si la exposición a hipoxia se mantiene durante horas o días (lo que se denomina hipoxia crónica) se activan mecanismos más lentos que implican la regulación de la expresión génica por factores de transcripción inducibles por hipoxia (*hypoxia inducible factors*, HIFs). Estos factores inducen la expresión de genes que favorecen, entre otras, la angiogénesis y la eritropoyesis para la distribución y transporte de O_2 a los tejidos e incrementan la producción de ATP por vía glucolítica (Semenza, 2012; Ratcliffe, 2013). Esta Tesis Doctoral se centra en el estudio de los mecanismos adaptativos que se ponen en marcha en respuesta a la hipoxia aguda.

1. Sistema homeostático sensor agudo de oxígeno

Las respuestas adaptativas a la hipoxia aguda dependen de un conjunto de órganos que forman el sistema homeostático sensor de O_2 y que contienen células neurosecretoras o musculares lisas capaces de detectar cambios en los niveles de O_2 . Entre los diversos componentes del sistema homeostático de O_2 destacan las células de musculo liso de arterias pulmonares y sistémicas, los cuerpos neuroepiteliales del pulmón, las células cromafines de la médula adrenal (MA) y las células neurosecretoras de los quimiorreceptores arteriales periféricos (cuerpos carotídeos y aórticos) (Weir *et al.*, 2005).

Introducción

Las células de músculo liso de la arteria pulmonar son capaces de detectar variaciones en la presión parcial de oxígeno (PO_2) y contraerse en condiciones de hipoxia. Este fenómeno se denomina vasoconstricción pulmonar hipóxica (VPH) y tiene como objetivo derivar el flujo sanguíneo hacia zonas del pulmón mejor ventiladas. Por el contrario, en las arterias sistémicas se produce una vasodilatación en respuesta a hipoxia para favorecer el aporte de oxígeno al tejido hipóxico (Weir y Archer, 1995; Franco-Obregón y López-Barneo, 1996).

Los cuerpos neuroepiteliales están compuestos por grupos de células neuroendocrinas situadas en el epitelio de los bronquiolos, donde detectan cambios en la concentración de O_2 del aire inspirado. Ante una disminución de O_2 , las células neuroendocrinas liberan aminas y péptidos, que activan las fibras aferentes, que mandan la información al sistema nervioso central y regulan los parámetros respiratorios para la obtención de más O_2 (Jonz y Nurse, 2012).

La MA es uno de los órganos endocrinos que forma parte de las glándulas suprarrenales, localizadas en la parte superior de cada riñón. Se compone de células neurosecretoras, denominadas células cromafines, que actúan como quimiosensores polimodales, que responden, entre otros estímulos, a una disminución de los niveles de O_2 en sangre secretando catecolaminas al torrente circulatorio, fundamentalmente adrenalina y noradrenalina (Muñoz-Cabello *et al.*, 2005; Livermore *et al.*, 2011). Esta elevación de catecolaminas en sangre es responsable de parte de las adaptaciones cardiovasculares que se producen durante una hipoxia aguda.

Dentro del sistema homeostático sensor de O_2 destacan los quimiorreceptores arteriales localizados junto a las arterias aórtica y carótida. Los cuerpos aórticos son estructuras paraganglionares que se distribuyen de forma irregular por las ramas derivadas del nervio vago; están en torno a los arcos aórticos, cerca de las arterias carótida y subclavia. Los quimiorreceptores periféricos más importantes en mamíferos superiores y en el hombre son los cuerpos carotídeos (CC), localizados en las bifurcaciones de las arterias carótidas, y de ellos dependen los reflejos respiratorios (respuesta ventilatoria a hipoxia; RVH) y cardiovasculares (incremento del gasto cardiaco) necesarios para la adaptación aguda a la hipoxia (López-Barneo *et al.*, 2001; Livermore *et al.*, 2011).

2. Fisiología del cuerpo carotídeo

2.1. Aspectos generales sobre la estructura y función del cuerpo carotídeo

El CC es un sensor polimodal capaz de detectar cambios de presión arterial de O_2 (PaO_2) y de dióxido de carbono ($PaCO_2$), siendo activado por hipoxia e hipercapnia

Introducción

respectivamente (de Castro, 1928; Heymans *et al.*, 1930; Eyzaguirre *et al.*, 1965). Además, se activa también en respuesta a otros estímulos como hipoglucemia (Pardal y López-Barneo, 2002; García-Fernández *et al.*, 2007; Fitzgerald *et al.*, 2009) o acidosis (Eyzaguirre y Koyano, 1965).

Los CC se localizan bilateralmente en las bifurcaciones de las arterias carótidas (Figura 1 A). Es un órgano muy irrigado, ya que dispone de abundantes vasos sanguíneos entreteljidos en su parénquima, y presenta una tasa de consumo de O₂ muy alta (Daly *et al.*, 1954; Starlinger y Lubbers, 1976). El CC deriva embriológicamente de la cresta neural (Le Douarin, 1986; Jiang *et al.*, 2000; Pardal *et al.*, 2007). Desde el CC parten fibras aferentes que son conducidas al sistema nervioso central a través del nervio del seno carotídeo, que es una rama del nervio glossofaríngeo o par craneal IX. También recibe inervación eferente compuesta fundamentalmente de fibras simpáticas postganglionares procedentes del ganglio cervical superior (GCS) (Fidone y González, 1986). Histológicamente está constituido principalmente por dos tipos de células (tipo I y II) que se agrupan formando agregados celulares llamados glomérulos (Figura 1 B).

Las células tipo I, también denominadas células glómicas o células principales, son de tipo neuronal, tienen una forma más o menos esférica, de unos 10 µm de diámetro, y son las más numerosas en el CC (López-Barneo *et al.*, 2009) (Figura 1 B y C). Estas células se caracterizan por presentar un alto número de mitocondrias en el citoplasma y vesículas de núcleo denso que contienen distintos neurotransmisores como ATP, acetilcolina, dopamina y varios neuropéptidos (Nurse y Piskuric, 2013). Además, tienen un alto contenido en dopamina, por lo que presentan una elevada expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), y se pueden marcar fácilmente con un anticuerpo anti-TH que permite identificarlas por inmunohistoquímica. Las células glómicas son los elementos sensores de O₂ del CC (ver más adelante) y establecen uniones sinápticas con terminaciones nerviosas aferentes (“sinapsis quimiosensora”) que terminan en el centro respiratorio y en otras estructuras centrales, como el núcleo del trato solitario y en un área de la médula llamada *rostral ventrolateral medulla*. Desde estas áreas centrales se regulan, respectivamente, la frecuencia y el volumen respiratorio (de Castro, 1926, 1928; Eyzaguirre, 1961) y el tono del sistema nervioso simpático (Guyenet, 2000).

Las células tipo II o sustentaculares son de tipo glial. Son más pequeñas y alargadas que las células tipo I y se localizan en la periferia de los glomérulos rodeando a las células tipo I con sus elongaciones citoplásmáticas (Figura 1 B y C). Las células tipo II expresan marcadores de células gliales como la *glial acidic fibrillary protein*, por lo que

tradicionalmente se ha pensado que su función era meramente de soporte de las células tipo I. Sin embargo, recientemente se ha descrito que las células tipo II, o una subpoblación de ellas, son células madres del sistema nervioso periférico (SNP) que contribuyen al crecimiento del CC en condiciones de hipoxia crónica (Pardal *et al.*, 2007).

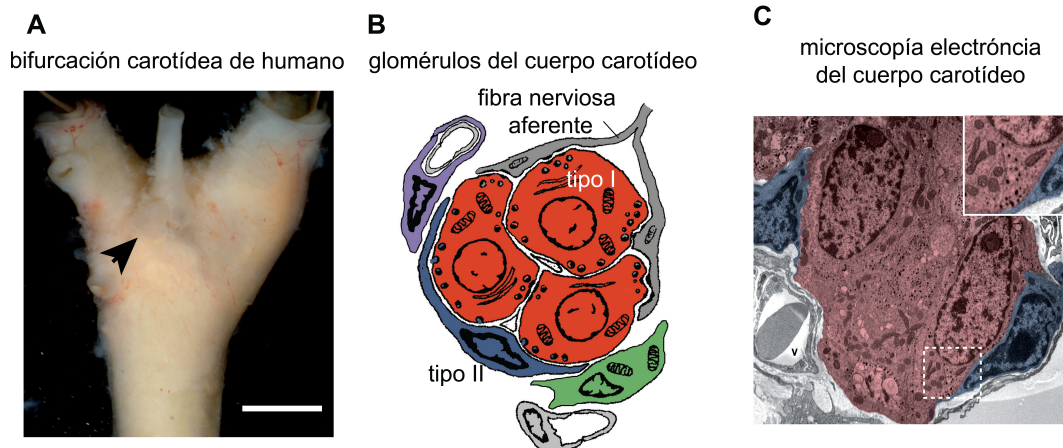


Figura 1. Estructura y organización del cuerpo carotídeo. (A) Fotografía de una bifurcación carotídea humana después de limpiarla de tejido conectivo y grasa permitiendo ver el CC (flecha). Escala: 1 cm. Bifurcación extraída de un donante de 42 años de edad. Modificado de Ortega-Sáenz *et al.*, (2013). (B) Representación esquemática de las células que componen los glomérulos del CC. Modificado de Pardal *et al.*, (2009). (C) Microfotografía electrónica ilustrando los dos tipos de células principales del CC de ratón; tipo I (coloreadas en rojo) envueltas por las células tipo II (en azul). El aumento (esquina superior derecha) muestra la abundancia de mitocondrias y vesículas secretoras en las células tipo I.

2.2. Modelo de membrana de quimiotransducción

Las células glómicas son elementos neurosecretores que, al detectar una disminución de la PaO₂ u otros estímulos, liberan neurotransmisores por exocitosis, lo que a su vez activa fibras nerviosas que estimulan a los centros respiratorios o vegetativos del tronco del encéfalo. Esta función sensorial de las células glómicas se debe a que son excitables, ya que poseen canales voltaje-dependientes de Na⁺, Ca²⁺ y K⁺ (Duchen *et al.*, 1988; López-Barneo *et al.*, 1988; Ureña *et al.*, 1994). El proceso de quimiotransducción que se activa en las células glómicas en respuesta a hipoxia se basa en la inhibición de canales de K⁺, entre los que se han descrito tanto canales de K⁺ dependientes de voltaje (López-Barneo *et al.*, 1988) como canales de fuga o *leakage* (Delpiano y Hescheler, 1989; Buckler, 1997) (Figura 2 A). La inhibición de canales de K⁺ produce la despolarización del potencial de membrana, que conlleva a la apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de potencial y a la entrada de calcio extracelular (Fishman *et al.*, 1985; Ureña *et al.*, 1994) (Figura 2 B). El incremento de calcio citosólico produce fusión de vesículas con la membrana plasmática y liberación de neurotransmisores

Introducción

(López-Barneo, 1993; Buckler y Vaughan-Jones, 1994; Ureña *et al.*, 1994) (Figura 2 C). Los neurotransmisores activan a las fibras nerviosas que transmiten la información hasta los centros respiratorios del tronco del encéfalo para activar la respuesta ventilatoria a hipoxia. Estos hallazgos permitieron establecer el modelo de membrana de quimiotransducción (Figura 2 D), donde las células glómicas actúan como elementos presinápticos capaces de detectar una disminución de O_2 .

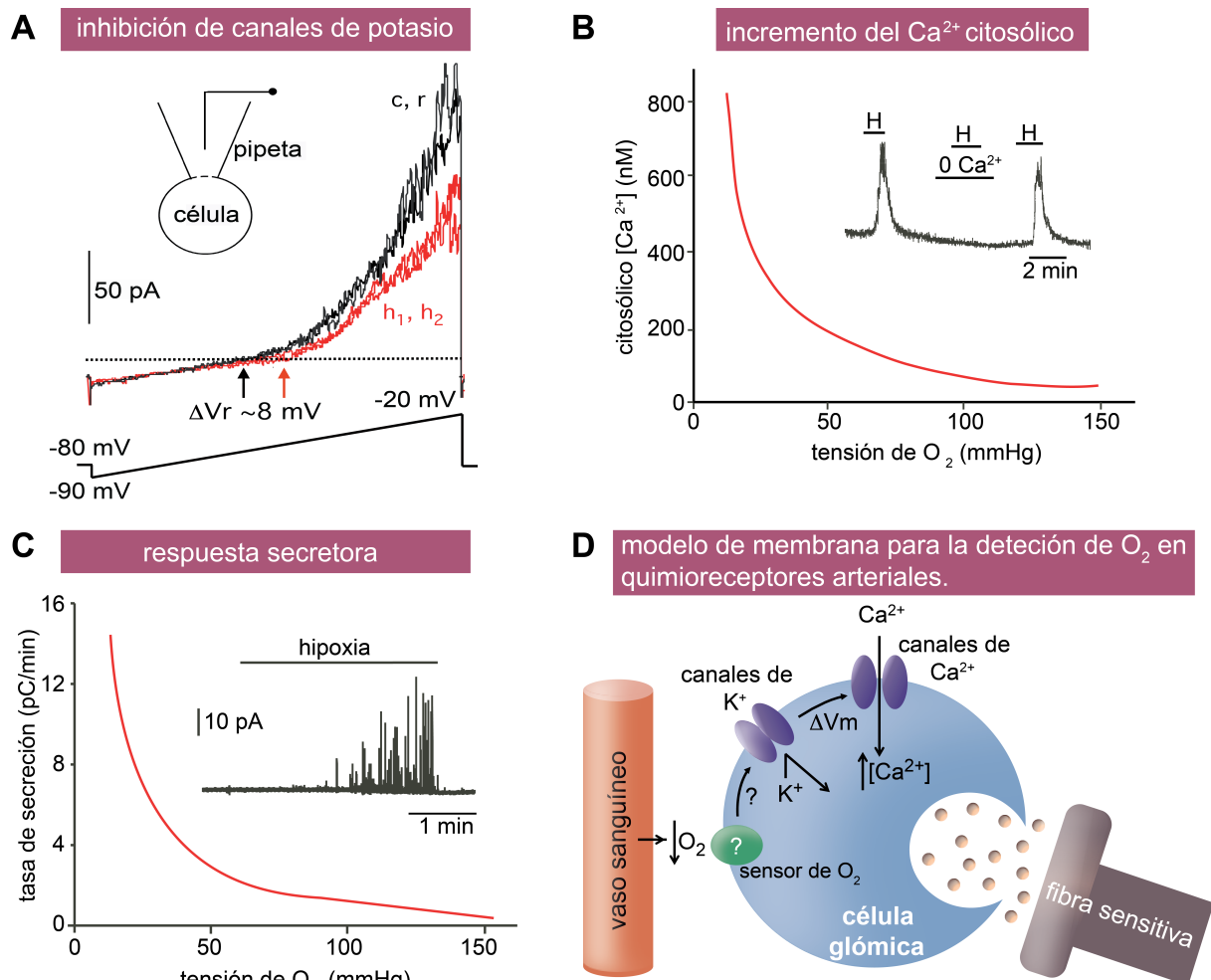


Figura 2. Respuesta a hipoxia aguda en células glómicas. (A) Corrientes de membranas registradas con la configuración de parche perforado durante un protocolo de despolarización de rampa. Nótese la reversible inhibición de la corriente de entrada y de las corrientes voltaje dependientes de potasio en las dos ocasiones que la célula fue expuesta a hipoxia (h_1 y h_2) ($PO_2 \sim 10$ mmHg). Los registros de control (c) y recuperación (r) se obtuvieron en condición de normoxia ($PO_2 \sim 145$ mmHg). (B y C) Incremento de calcio (B) y respuesta secretora (C) en función de la tensión de O_2 . En el gráfico de la dosis dependencia de calcio hay un registro representativo del incremento de calcio citosólico dependiente de calcio extracelular durante hipoxia. En el gráfico C hay un registro representativo de amperometría de la típica respuesta a hipoxia de una célula glómica. (Los datos del gráfico B proceden de Ureña *et al.*, (1994); los de los gráficos A y C de Montoro *et al.*, (1996) y Ortega-Sáenz *et al.*, (2006). (D) Modelo de membrana de quimiotransducción mediado por las células glómicas, modificado de López-Barneo *et al.*, (2003).

A pesar de que el modelo de membrana de quimiotransducción se encuentra ampliamente aceptado en el campo de la detección de hipoxia aguda, se desconoce cuál es el mecanismo que usan las células quimiorreceptoras para detectar la disminución de O₂ en sangre (o en medio extracelular) y cuál o cuáles son las moléculas que señalizan a los canales de K⁺ de la membrana plasmática para inhibirlos.

3. Hipótesis actuales sobre el “sensor de oxígeno” del cuerpo carotídeo

Durante las últimas décadas se han propuesto distintas hipótesis para describir el sensor de oxígeno de las células glómicas del CC (López-Barneo *et al.*, 2016). En este apartado se resume brevemente aquellas que se consideran especialmente relevantes para los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral.

3.1. Hipótesis mitocondrial

Clásicamente se han considerado a las mitocondrias como candidatas para detectar la disminución de O₂ en las células glómicas del CC, basándose en que es el orgánulo donde se produce un mayor consumo de oxígeno, y dada la exquisita sensibilidad del CC a los inhibidores de la CTE mitocondrial. Se ha descrito que al bloquear distintos complejos mitocondriales hay una activación de las células glómicas de forma similar a la hipoxia aguda, indicando una comunicación entre las mitocondrias y los canales de la membrana plasmática (Mills y Jobsis, 1972; Mulligan y Lahiri, 1982; Ortega-Sáenz *et al.*, 2003). Además de las dos premisas anteriores, las mitocondrias son candidatas porque existen parámetros mitocondriales, como el potencial de membrana mitocondrial o la autofluorescencia de NADH, que son muy sensibles a cambios de los niveles de PO₂ (Duchen y Biscoe, 1992b, a). Apoyando esta hipótesis se propuso que el incremento de Ca²⁺ intracelular, que se producía en las células glómicas en respuesta a hipoxia, se debía a la liberación de Ca²⁺ almacenado en las mitocondrias (Duchen y Biscoe, 1992b). Sin embargo, pronto se demostró que, como se describió en el apartado anterior, el aumento de Ca²⁺ citosólico se debe a una entrada de Ca²⁺ extracelular, debida a la apertura de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Figura 2 B) (Ureña *et al.*, 1994). El otro inconveniente de esta propuesta es que la CTE de la mayoría de las células se inhibe cuando los niveles de PO₂ alcanzan valores cercanos a la anoxia (PO₂ ~ 1-2 mmHg) y las células glómicas del CC son muchos más sensibles a hipoxia, siendo activadas incluso cuando los niveles de PaO₂ están por debajo de 60 mmHg. Para tratar de explicar este comportamiento del CC, se propuso la existencia de mitocondrias con una isoforma especial de citocromo c oxidasa o complejo

Introducción

mitocondrial IV (CMIV) con baja afinidad por oxígeno (Mills y Jobsis, 1972). Sin embargo, en su formulación inicial se consideraba que esta forma especial de CMIV se localizaba en las células tipo II (Mills y Jobsis, 1972) que posteriormente se ha mostrado que no son quimiosensitivas. Solo en fecha reciente se han descrito características moleculares especiales del CMIV de las células glómicas en comparación con otras células neuronales del mismo origen embriológico (Gao *et al.*, 2017).

Una nueva perspectiva que señala a la mitocondria como orgánulo necesario para detectar la hipoxia en el CC se hizo evidente gracias a experimentos de nuestro grupo, donde se comparó la secreción de dopamina en rodajas de CC durante hipoxia con o sin la presencia de inhibidores de los distintos complejos mitocondriales (Ortega-Sáenz *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos demostraron que la secreción, inducida en rodajas de CC por los inhibidores de los complejos mitocondrial II, III y IV, incrementó cuando se expuso de forma concomitante a hipoxia. En la Figura 3 A se muestra un ejemplo representativo del efecto aditivo de la hipoxia y el cianuro, inhibidor del CMIV. Sin embargo, la exposición a dosis saturantes de rotenona, inhibidor del complejo mitocondrial I (CMI), abolió la respuesta secretora inducida por la hipoxia en rodajas de CC (Figura 3 B). La rotenona es capaz de inhibir al CMI uniéndose al sitio de unión de la ubiquinona. No obstante, el uso de DPI, inhibidor del CMI que actúa en un sitio diferente al de la rotenona, no fue capaz de bloquear la respuesta a hipoxia. Como se ilustra en la Figura 3 C, de todos los inhibidores mitocondriales utilizados, solo la rotenona fue capaz de abolir la respuesta a hipoxia, sugiriendo que el sitio de unión a ubiquinona en el CMI tiene un papel importante para detectar la disminución de O₂ por las células glómicas.

Para comprobar si el sitio de unión a ubiquinona del CMI es necesario para la respuesta a hipoxia mediada por el CC, se generó en nuestro laboratorio un modelo de ratón genéticamente modificado con una ablación embrionaria en células catecolaminérgicas del gen *Ndufs2*, el cual codifica una proteína de 49-kDa, que contribuye al sitio de unión de ubiquinona del CMI (Figura 4); (Kashani-Poor *et al.*, 2001; Baradaran *et al.*, 2013; Fernández-Agüera *et al.*, 2015). A este modelo se le denominará TH-NDUFS2. El sitio de unión a ubiquinona, es donde tiene lugar la transferencia de electrones desde el centro sulfoférico (Fe-S) a la ubiquinona, que es el último paso en la reacción de la NADH/ubiquinona oxidoreductasa. Este último grupo Fe-S, que se denomina N2, cede electrones a la ubiquinona (CoQ), para producir ubiquinol (CoQH₂) (Baradaran *et al.*, 2013; Hirst, 2013).

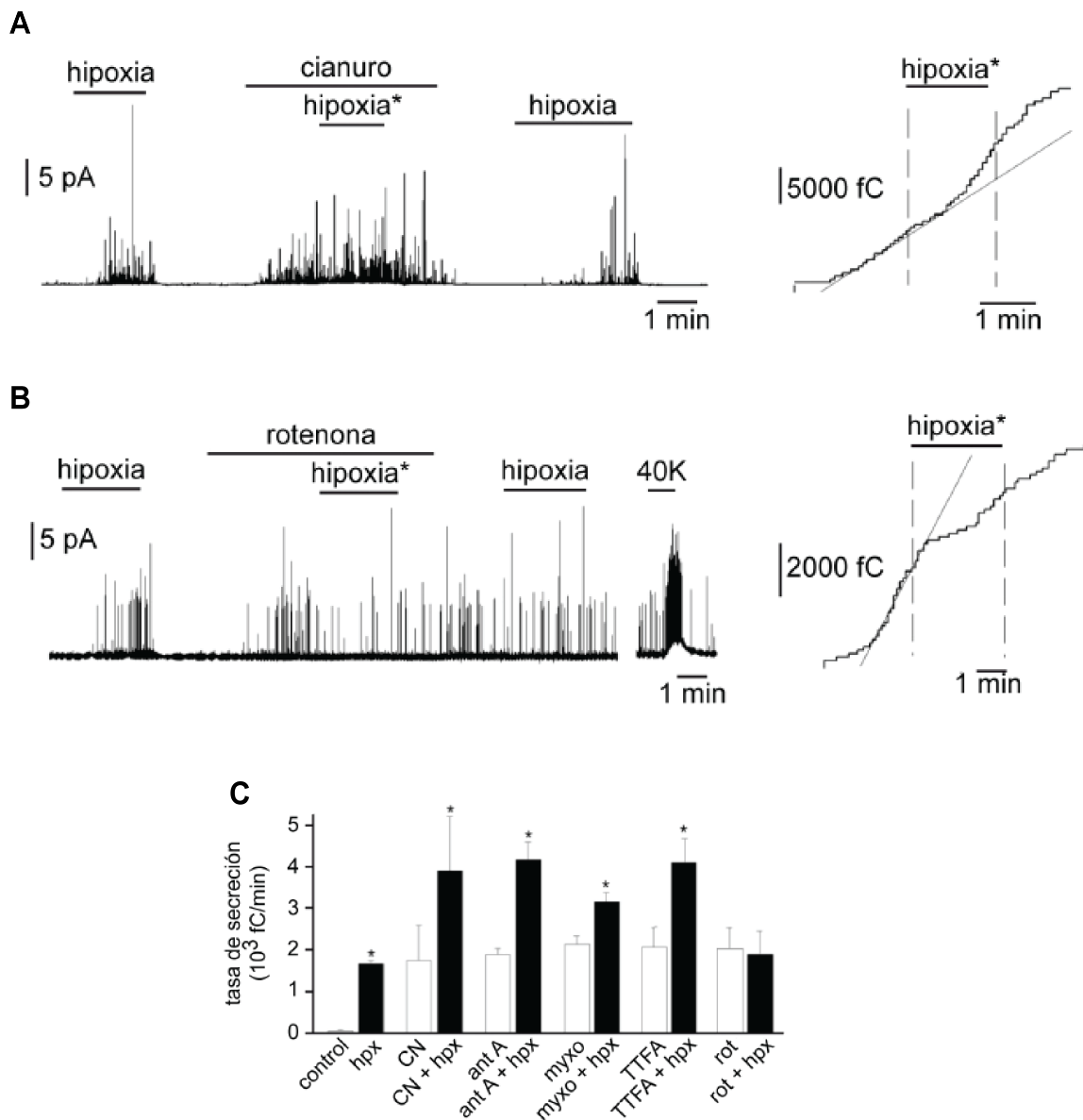


Figura 3. Efecto de los inhibidores mitocondriales sobre la respuesta a hipoxia de las células glómicas. (A) Registro amperométrico representativo de la potenciación de la respuesta a hipoxia de las células glómicas en presencia de cianuro (izquierda). Nótese el incremento de pendiente de la secreción acumulada cuando se aplica la hipoxia en presencia de cianuro (derecha). (B) Registro amperométrico representativo de la inhibición de la respuesta a hipoxia de las células glómicas en presencia de rotenona (izquierda). Nótese la disminución de la pendiente de la secreción acumulada cuando se aplica la hipoxia en presencia de rotenona (derecha). (C) Cuantificación de la tasa de secreción en rodajas de CC en normoxia (barras blancas) y en hipoxia (barras negras); y el efecto de aplicar inhibidores de los complejos mitocondriales IV, III, II y I en ambas condiciones. (CN), antimicina A (ant A), myxotiazol (myxo), tenoil trifluoro acetona (TTFA), y rotenona (rot), hipoxia (hpx). Nótese que no hay efecto sumatorio al aplicar rotenona e hipoxia juntos. Modificado de Ortega-Sáenz *et al.*, (2003).

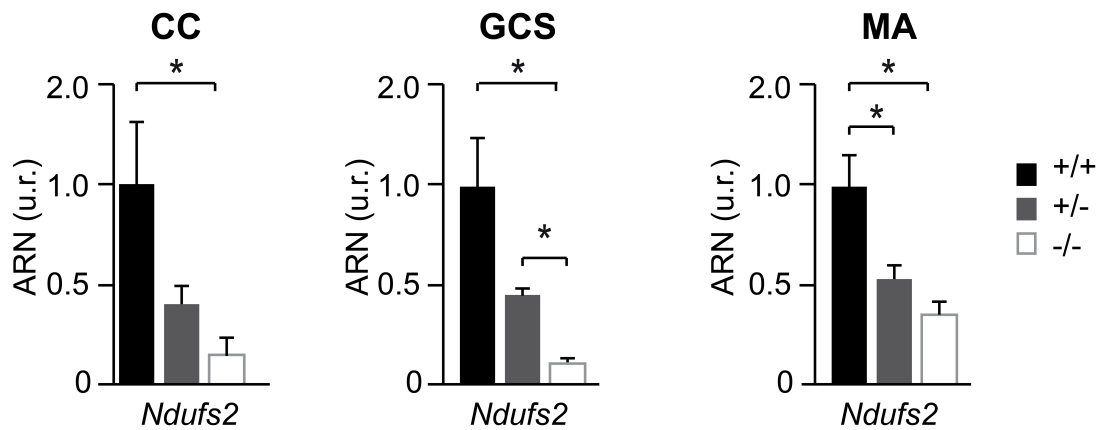


Figura 4. Análisis de la expresión de *Ndufs2* en tejidos catecolaminérgicos del sistema nervioso periférico de ratones TH-NDUFS2. Cantidad relativa de ARNm del gen *Ndufs2* en cuerpo carotídeo (CC; A), ganglio cervical superior (GCS; B) y médula adrenal (MA; C). u.r. unidades relativas. * $p < 0,05$. Modificado de Fernández-Agüera *et al.*, (2015).

A nivel sistémico, los ratones TH-NDUFS2 presentaban una respiración aparentemente normal, pero tenían abolido el reflejo ventilatorio a hipoxia aguda (Fernández-Agüera *et al.*, 2015) (Figura 5).

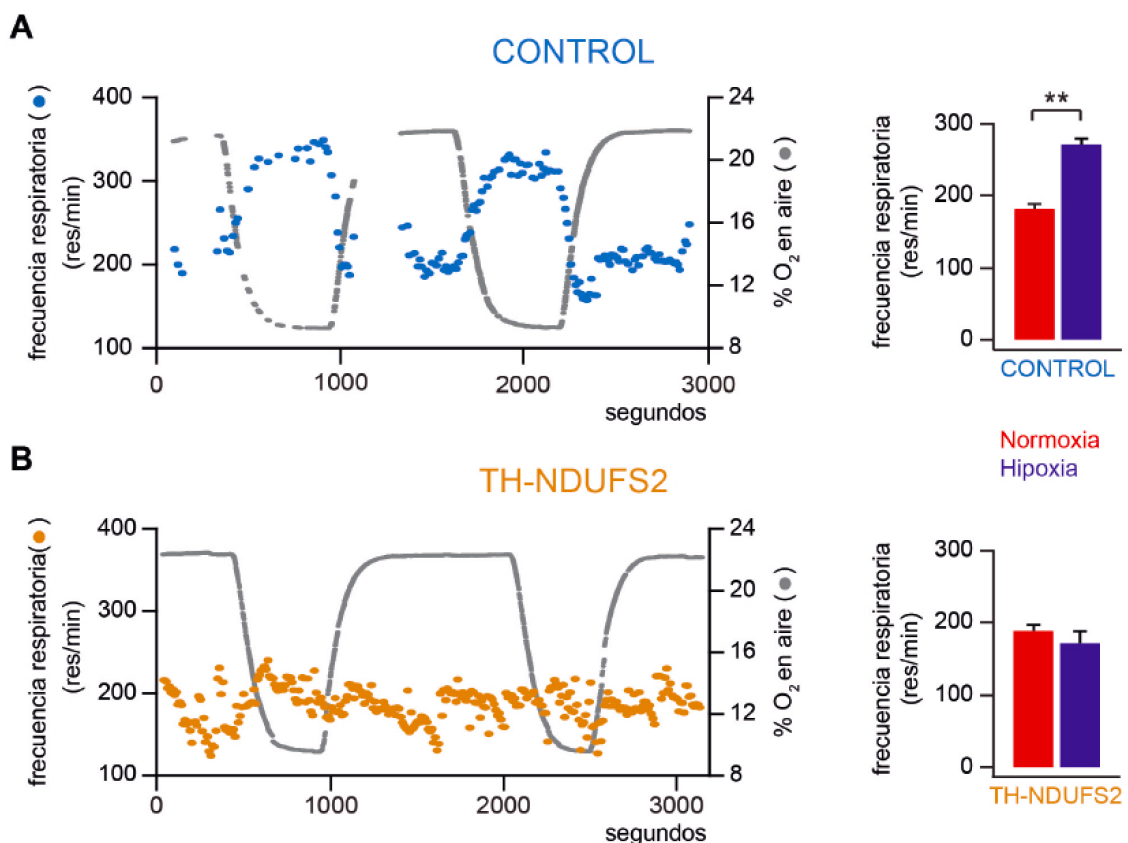


Figura 5. Abolición de la respuesta ventilatoria a hipoxia en ratones TH-NDUFS2. (A y B) Registros representativos del cambio de la frecuencia ventilatoria de un ratón control (A, izq) y TH-NDUFS2 (B, izq) durante normoxia (21% de O_2) y en hipoxia aguda (10% de O_2). Cuantificación del incremento de la frecuencia respiratoria durante hipoxia aguda en el grupo de ratones estudiados (drch). Nótese que la frecuencia respiratoria no varía entre periodos de normoxia e hipoxia en los ratones TH-NDUFS2. ** $p < 0,01$. Modificado de Fernández-Agüera *et al.*, (2015).

Introducción

A nivel de celular, las células glómicas de los ratones TH-NDUFS2 tenían preservadas las características morfológicas, así como los niveles de ATP celular. Sin embargo, estas células eran insensibles a cambios de PO_2 medidos con la técnica de amperometría en rodajas de CC (Figura 6 A y B) o con la técnica de microfluorimetría midiendo el incremento de calcio citosólico en células glómicas dispersas (Figura 6 C) (ver “Métodos”).

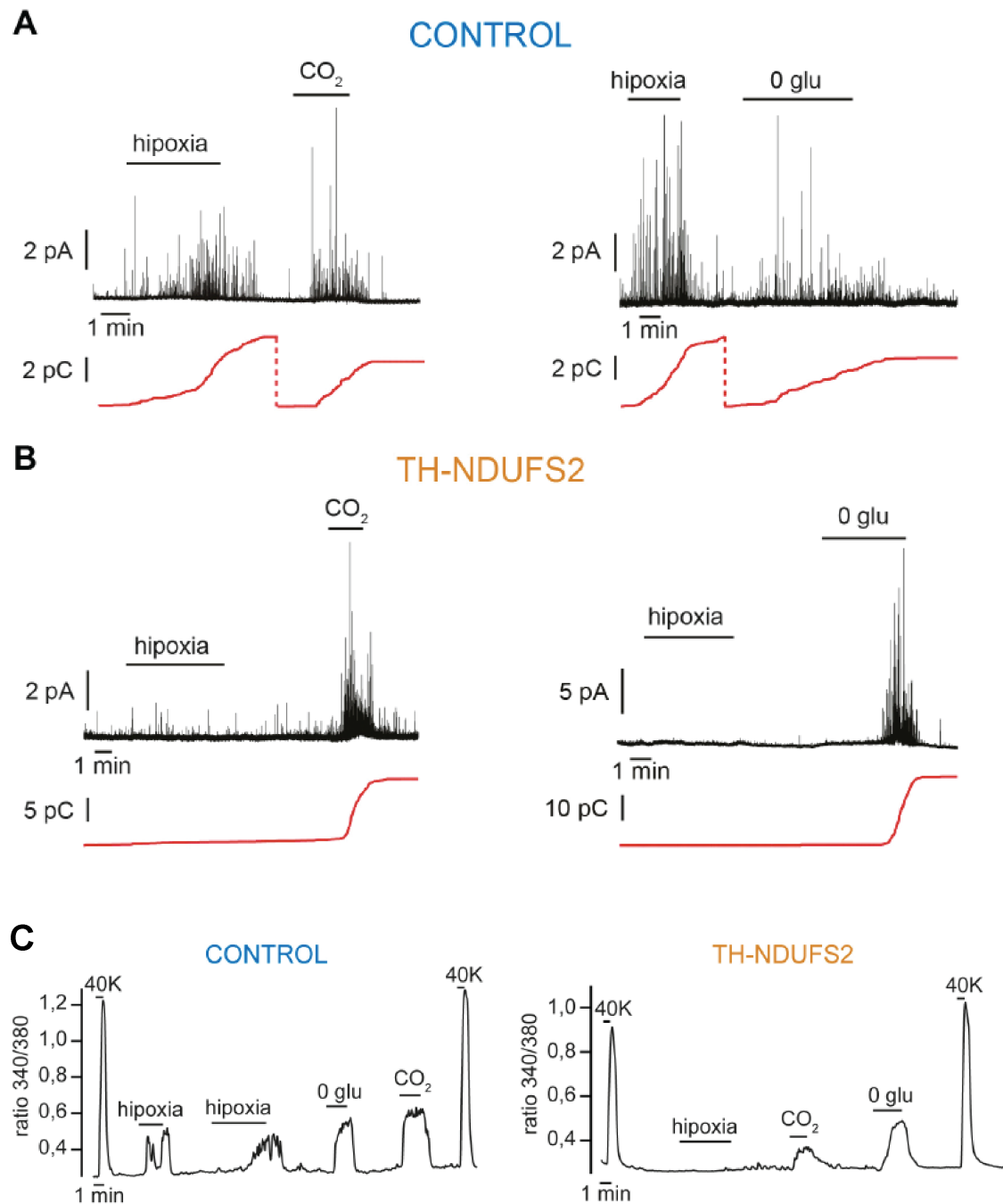


Figura 6. Abolición de la respuesta a hipoxia en células glómicas de ratones TH-NDUFS2. (A,B) Registros amperométricos representativos de rodajas de cuerpo carotídeo controles (A, azul) y TH-NDUFS2 (B, marrón). La línea roja bajo los registros representa la secreción acumulada; la línea discontinua indica el reinicio del integrador. (C) Registros representativos de los cambios en la $[Ca^{2+}]_{in}$ en células controles (azul) y TH-NDUFS2 (marrón). Modificado de Fernández-Agüera *et al.*, (2015).

Introducción

No obstante, las células glómicas podían ser activadas por otros estímulos como alto potasio, hipercapnia o hipoglucemia en ambas técnicas (Figura 6). Las células glómicas de los ratones TH-NDUFS2 mostraron una abolición de la regulación de la corriente de K^+ por la hipoxia (Figura 7), lo que explicaba la falta de activación de las células glómicas medida a nivel de secreción dopaminérgica y a nivel de calcio citosólico (Fernández-Agüera *et al.*, 2015).

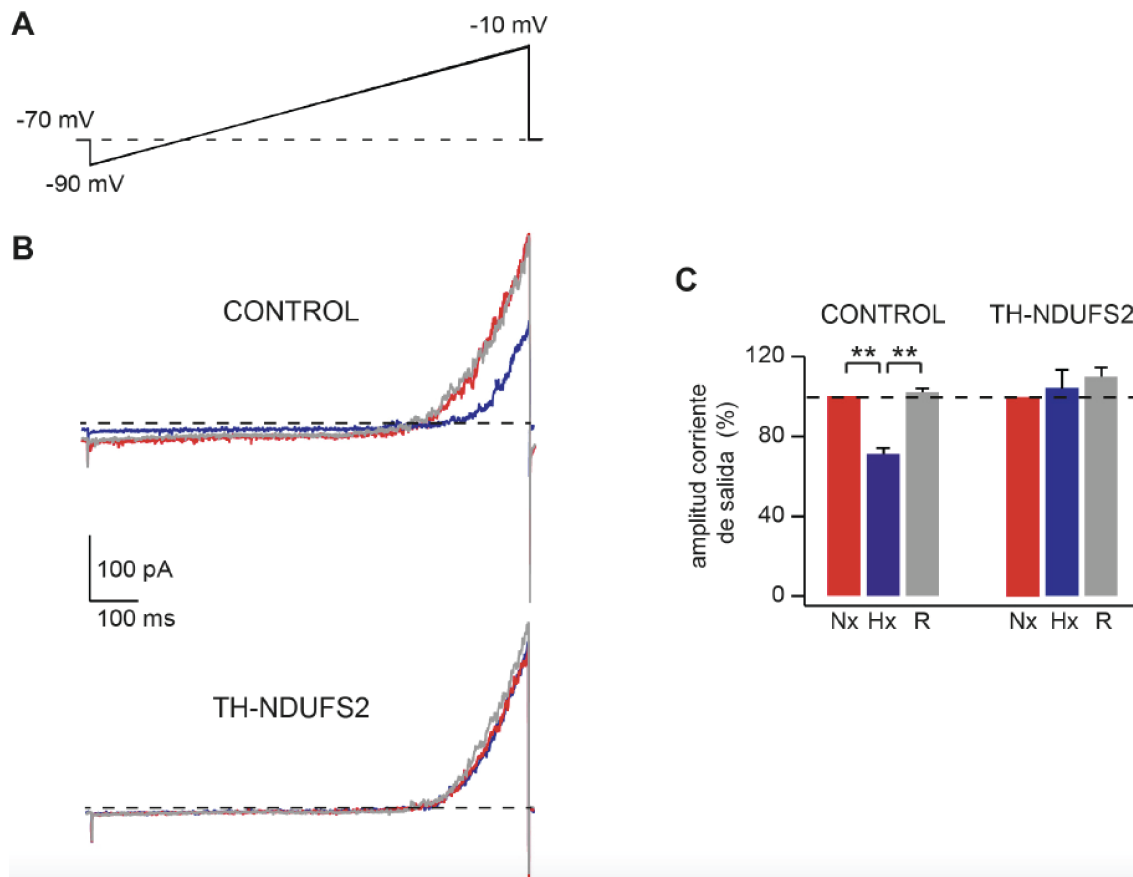


Figura 7. Abolición de la inhibición por hipoxia de los canales de potasio en células glómicas de ratones TH-NDUFS2. (A) Protocolo de rampa despolarizante aplicado a las células glómicas dispersas registradas con la técnica de *patch-clamp* en la configuración de parche perforado. (B) Corrientes registradas en células controles (arriba) y TH-NDUFS2 (abajo) en condiciones de normoxia (rojo), hipoxia (azul) y recuperación tras volver a normoxia (gris). (C) Cuantificación de la amplitud de la corriente de K^+ (a -10 mV) normalizada con respecto a la condición de normoxia en células controles y TH-NDUFS2. La línea discontinua indica el 100% del valor empleado para normalizar. Nx: normoxia; Hx: hipoxia; R: recuperación. ** $p < 0,01$. Modificado de Fernández-Agüera *et al.*, (2015).

Se ha demostrado que durante hipoxia se produce en las células glómicas un incremento reversible de los niveles de especie reactivas de oxígeno (ROS) y de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y que estos cambios se abolen en los ratones TH-NDUFS2. Se ha propuesto que estas moléculas actúan mediando la interacción entre la

mitocondria y los canales de la membrana plasmática para promover la activación de las células glómicas en hipoxia (Fernández-Agüera *et al.*, 2015) (Figura 8).

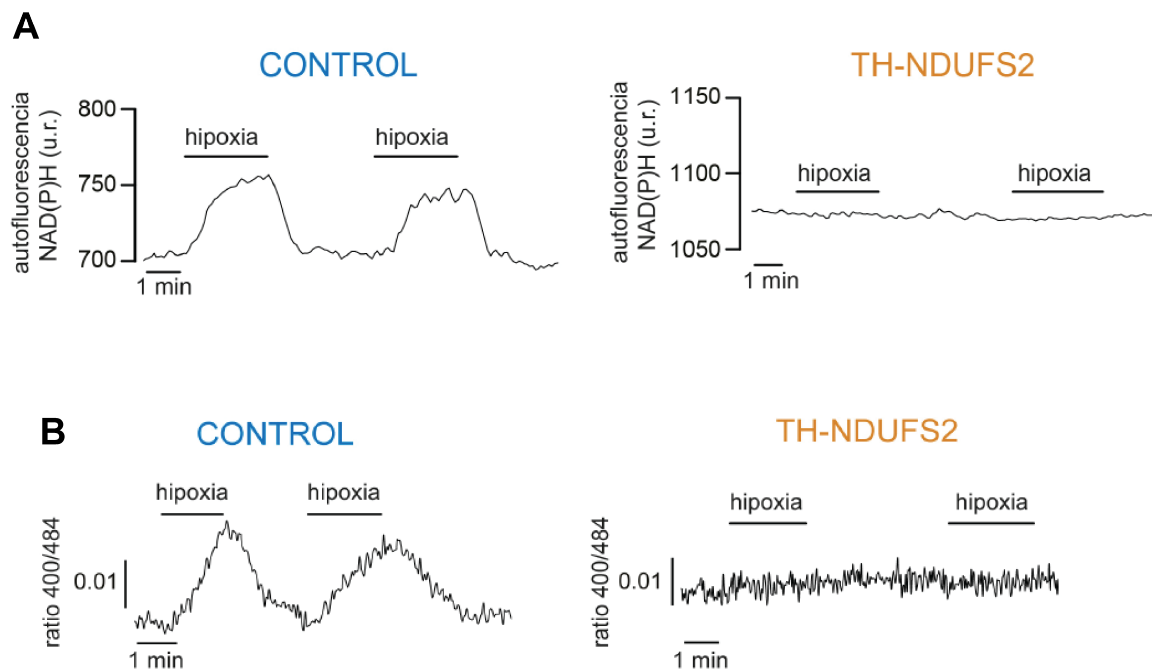


Figura 8. Abolición del incremento de las moléculas señaladoras (NADH y ROS) en células glómicas de ratones TH-NDUFS2 durante hipoxia. (A) Registros representativos del incremento de NADH en células glómicas dispersas de ratones controles (azul) y de ratones TH-NDUFS2 (marrón). (B) Registros representativos del incremento de ROS en rodajas del cuerpo carotídeo de ratones controles (azul) y de ratones TH-NDUFS2 (marrón). Nótese que el incremento de ambas moléculas está abolido en las células glómicas de los ratones TH-NDUFS2. Modificado de Fernández-Agüera *et al.*, (2015).

Tomados conjuntamente, los resultados previos de nuestro grupo obtenidos en los ratones TH-NDUFS2 indican que durante la disminución de los niveles de oxígeno en sangre se produce un enlentecimiento de la CTE mitocondrial en las células glómicas, que conduce a una acumulación de quinona reducida (CoQH_2) y al subsiguiente enlentecimiento de la actividad oxidoreductasa del CMI. La disminución de la actividad del CMI provoca acumulación de NADH y una fuga de electrones que incrementa los niveles de ROS en el espacio intermembrana (EIM-ROS) y en el citosol. Este incremento de NADH y ROS es el responsable de inhibir los canales de potasio de la membrana plasmática y desencadenar la respuesta a hipoxia mediada por el CC (Figura 9) (Fernández-Agüera *et al.*, 2015).

Aunque los resultados obtenidos a partir del modelo TH-NDUFS2 son sólidos y reproducibles, este modelo tiene algunas limitaciones. La primera es que al tratarse de un modelo embrionario cabría la posibilidad de que se produjeran modificaciones genéticas

adaptativas por la ablación del gen *Ndufs2* durante el desarrollo embrionario y que estas modificaciones afectasen a la capacidad para responder a hipoxia de estos ratones. Otra limitación del modelo es que los parámetros electrofisiológicos, como la resistencia de entrada o el potencial de membrana, estaban alterados. Además, las células glómicas del CC de los ratones TH-NDUFS2 presentaban un alto nivel basal de NADH y ROS en comparación con las células glómicas de ratones controles. El elevado ratio NADH/NAD⁺ y el alto nivel de oxidación celular podrían ser los responsables de la insensibilidad a hipoxia aguda de las células glómicas en los ratones TH-NDUFS2, siendo estas moléculas incapaces de incrementar aún más los niveles en respuesta a hipoxia.

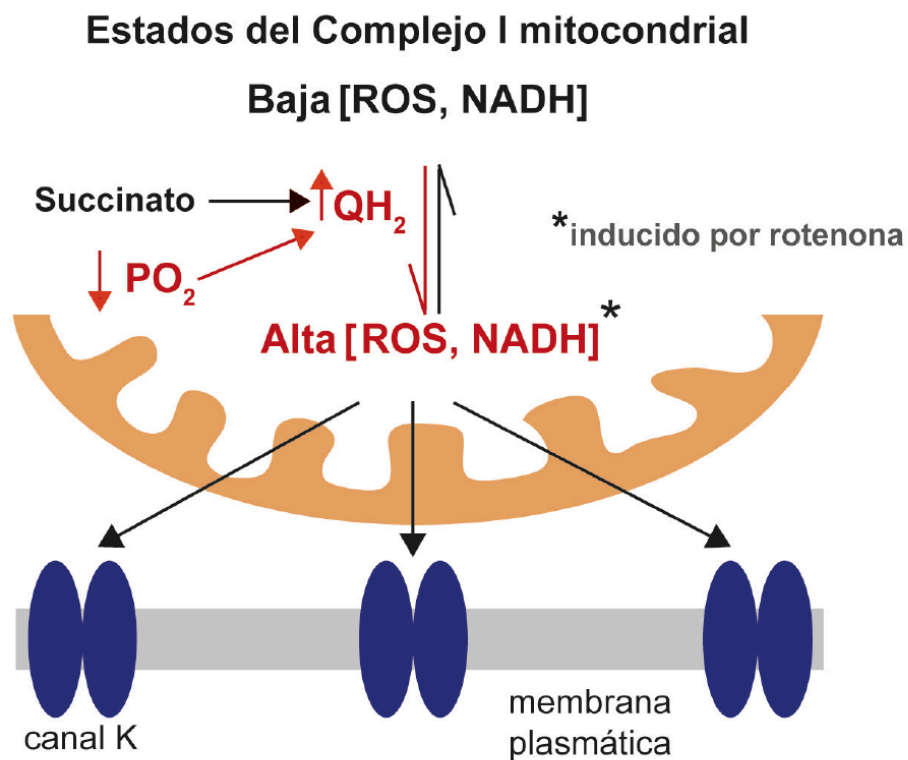


Figura 9. Modelo de sensibilidad a la hipoxia aguda en los quimiorreceptores arteriales. QH2: ubiquinona reducida. Modificado de Fernández-Agüera *et al.*, (2015).

Para solventar estos problemas, se generó un nuevo modelo de estudio en animales adultos (ratón ESR-NDUFS2). En este modelo la delección del gen *Ndufs2* se indujo, en ratones de 2 meses de edad, mediante el tratamiento durante un mes con una dieta rica en tamoxifeno, TMX (ver “Métodos”). De esta forma evitamos que se produzcan mecanismos adaptativos durante el desarrollo embrionario ante la delección del gen *Ndufs2*. Este nuevo modelo presentaba una estructura histológica del CC similares al de los controles, tanto en

volumen como en número de células TH⁺ (Fernández-Agüera *et al.*, 2015). Sin embargo, a partir de la séptima semana desde el inicio del tratamiento con TMX, el deterioro de los ratones ESR-NDUFS2 fue evidente, presentando una pérdida de peso significativa (Fernández-Agüera *et al.*, 2015) y en solo dos meses desde el inicio del tratamiento acababan muriendo. En este trabajo no hemos estudiado otras alteraciones sistémicas ni las causas de la muerte de los animales, que suponemos relacionadas con alteraciones pleiotrópicas (renales, metabólicas y cardíacas, entre otras) debidas a la disfunción mitocondrial.

En esta Tesis Doctoral se analiza el fenotipo sistémico y celular del ratón ESR-NDUFS2 y la forma en que estos datos apoyan el modelo de respuesta a hipoxia aguda en las células glómicas del CC basado en la interacción entre la mitocondria y la membrana celular.

3.2. El receptor Olf78 como sensor de hipoxia del cuerpo carotídeo

Dado que la clarificación de los mecanismos celulares/moleculares responsables de la detección de la hipoxia aguda sigue siendo uno de los retos fundamentales de la Fisiología contemporánea, coincidente con la enunciación del modelo de Fernández-Agüera *et al.* (2015) descrito en el apartado anterior, apareció un artículo donde se proponía que el receptor olfatorio Olf78, que se expresa atípicamente en el CC y otros órganos periféricos, era esencial para detectar la hipoxia aguda en las células glómicas del CC (Chang *et al.*, 2015). Estos autores sugieren que los cambios en los niveles de oxígeno en sangre no son detectados directamente por las células glómicas, sino indirectamente a través de un metabolito, el lactato, cuya concentración en sangre está regulada por la disponibilidad de oxígeno a nivel sistémico y que mediante su unión al receptor Olf78 es capaz de activar al CC y promover la RVH.

3.2.1. Receptor Olf78 e hipoxia

El receptor olfatorio Olf78, también conocido como MOL2.3 y MOR18-2, está altamente expresado en el epitelio olfatorio, pero además se encuentra expresado atípicamente en el CC (Chang *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016) y en otros tejidos de ratón tales como el bulbo raquídeo (Conzelmann *et al.*, 2000), los ganglios simpáticos y parasimpáticos (Weber *et al.*, 2002), riñón (Pluznick *et al.*, 2013), y colon (Fleischer *et al.*, 2015). El Olf78 es un receptor de la subfamilia de los receptores acoplados a proteínas G que se activa por ácidos grasos de cadena corta (Pluznick *et al.*, 2013; Fleischer *et al.*, 2015). Chang *et al.*, (2015) describieron que la eliminación de la expresión del gen *Olf78* en ratones modificados genéticamente abole selectivamente la RVH (Figura 10 A) sin afectar a la respuesta a

hipercapnia (Figura 10 B) medida en animal completo; y que esta pérdida de la respuesta sistémica a hipoxia se debe a que los CC de los ratones KO para *Olfcr78* no responde a hipoxia (Figura 11), indicando que el receptor *Olfcr78* es esencial para la detección de hipoxia por las células del CC.

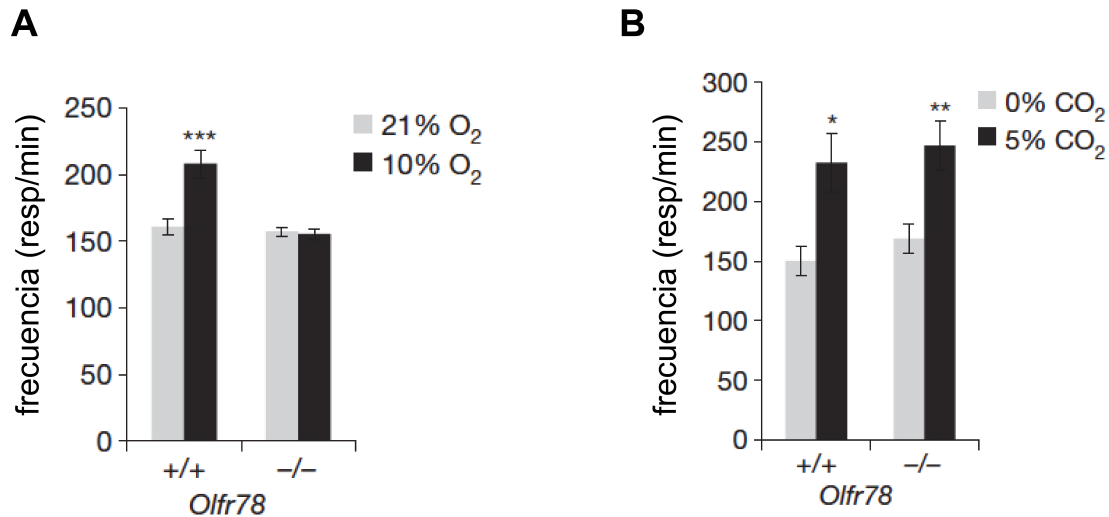


Figura 10. Pérdida selectiva de la respuesta a hipoxia en animales completos *Olfcr78*. (A y B) Media de la frecuencia ventilatoria comparada en animales controles (+/+) y animales *knockout* para *Olfcr78* (-/-) durante hipoxia (A) y durante hipercapnia (B). resp. respiraciones y min. minutos. Gráficos modificados de Chang *et al.*, (2015).

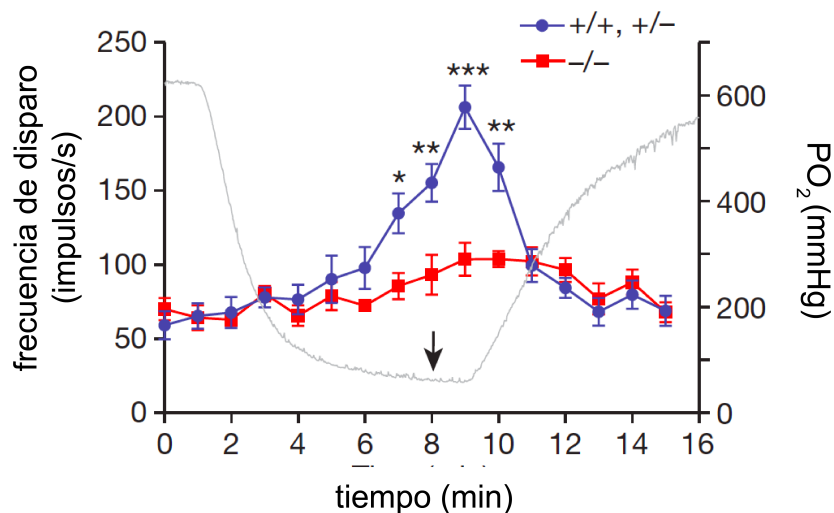


Figura 11. Pérdida de la respuesta a hipoxia en el nervio del seno de cuerpo carotídeo de ratones *Olfcr78*. Registros de medias comparativas de frecuencias de pulsos *in vitro* entre animales controles y heterocigotos (+/+ y +/- en azul) con animales *knockout* para *Olfcr78* (-/- en rojo) durante hipoxia. La disminución de la PO₂ se representa con una línea gris en el gráfico. Gráfico modificado de Chang *et al.*, (2015).

3.2.2. Receptor *Olfcr78* y lactato

Chang *et al.*, (2015) han descrito que la concentración de lactato en sangre incrementa

en respuesta a hipoxia, y que la unión de lactato con el receptor Olfr78 produce la activación del nervio del seno carotídeo en ratones controles, estando abolida dicha respuesta en ratones *knockout* para *Olfr78* (Figura 12 A); (Chang *et al.*, 2015). Se ha sugerido que durante una disminución de O₂ hay un incremento de lactato en sangre que estimula al receptor Olfr78 de la membrana plasmática de las células glómicas desencadenando la liberación de neurotransmisores y la respuesta a hipoxia aguda a nivel sistémico (ver esquema Figura 12 B).

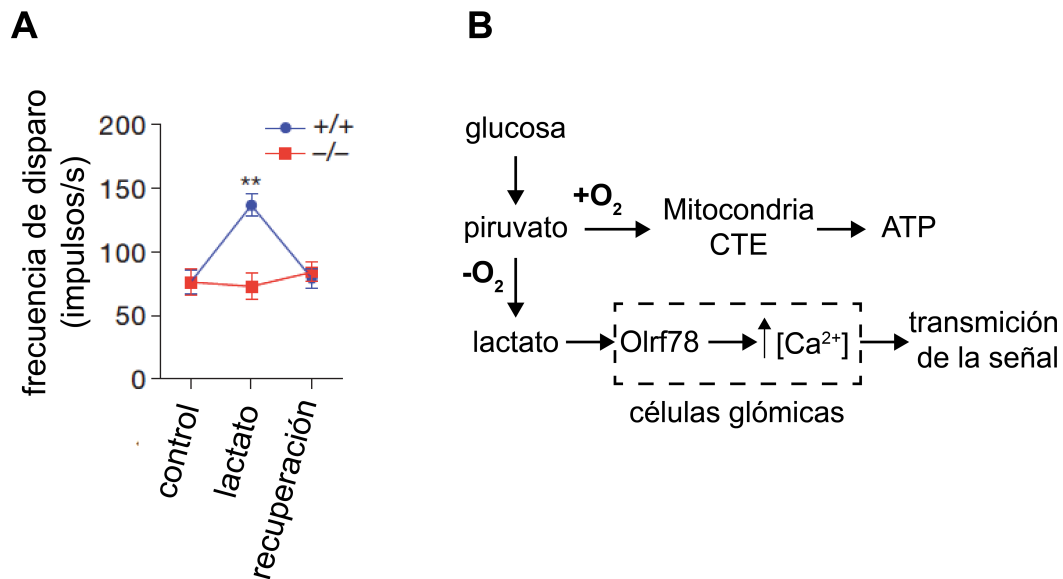


Figura 12. El lactato activa el receptor Olfr78 durante hipoxia. (A) Gráfico del incremento de la frecuencia de disparo durante un aumento de lactato extracelular en el nervio del seno carotídeo de animales controles (+/+, rojo) y no en ratones *knockout* para *Olfr78* (-/-, azul). (B) Modelo propuesto por Chang *et al.*, (2015) para detectar la hipoxia en las células glómicas del CC. Ambos gráficos han sido modificados de Chang *et al.*, (2015).

La hipótesis propuesta por Chang *et al.*, (2015) contrastaba con los resultados descritos previamente por nuestro grupo de investigación, sugiriendo que las mitocondrias son orgánulos esenciales para la respuesta a hipoxia mediada por las células glómicas del CC. Además, se ha demostrado en varios laboratorios que la respuesta celular a la hipoxia es autónoma; se observa en células dispersas superfundidas continuamente por solución extracelular libre de lactato. Dado su fuerte contraste con los datos previos de nuestro grupo, la comprobación de la hipótesis del lactato y de su activación del CC mediada por el Olfr78 ha sido uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral.

4. Metabolismo del lactato; importancia biológica

4.1. Producción y función de lactato

El ácido láctico o ácido 2-hidroxi-propanoico, es un ácido carboxílico de tres carbonos

Introducción

($C_3H_6O_3$) con un peso molecular de 89 g/mol. Fue descubierto por Scheele en el siglo dieciocho y posteriormente Pasteur (1858) describió la fermentación láctica en levaduras en condiciones anaeróbicas. Varias décadas después, los estudios de Fletcher demostraron la presencia de lactato en el músculo esquelético de rana durante anaerobiosis (Fletcher, 1907). En 1922 Hill y Meyerhof recibieron el premio Nobel por descubrir que durante el ejercicio intenso la glucosa se transforma en ácido láctico para obtener energía rápidamente sin utilizar la fosforilación oxidativa mitocondrial (Hill, 1914; Meyerhof, 1920; Hill y Lupton, 1923). Debido a estas observaciones el lactato se ha relacionado clásicamente con el estado de anaerobiosis.

El dogma tradicional del metabolismo glucolítico, diseñado en base a los acontecimientos históricos descritos en el párrafo anterior, es que el producto final de la glucólisis depende de la disponibilidad de O_2 : en condiciones aeróbicas el resultado de la glucólisis es el piruvato (que se transporta a la mitocondria), mientras que en condiciones anaeróbicas el producto final es el lactato. Actualmente se conoce que el producto final de la glucólisis, independientemente de la PO_2 , es fundamentalmente el lactato (Richardson *et al.*, 1998; Rogatzki *et al.*, 2015; Bendahan *et al.*, 2017). La función del lactato intracelular, es actuar como metabolito de unión entre la glucólisis, que ocurre en el citosol, y la fosforilación oxidativa, que tiene lugar en la mitocondria (Brooks *et al.*, 1984; Brooks, 2002, 2009, 2018). El paso del lactato desde el citosol hasta la mitocondria se produce gracias al transportador monocarboxílico de lactato tipo 1 (MCT1) localizado en el espacio intermembrana unido a la membrana interna mitocondrial (Hashimoto *et al.*, 2006). En la mitocondria el lactato se convierte en piruvato, que puede catabolizarse en el ciclo de Krebs o servir para la producción de oxalacetato. El lactato es por lo tanto un sustrato mitocondrial y tiene un papel principal en la homeostasis del ATP celular (Figura 13 A).

A nivel sistémico, el lactato se ha considerado un biomarcador de estrés, un producto de desecho como consecuencia de la hipoxia, uno de los causantes de la fatiga muscular y un agente productor de daños tisulares por la acidosis láctica. Sin embargo, actualmente se conoce que participa en al menos tres funciones de vital importancia:

1. El lactato como fuente de energía. Experimentos con isótopos radiactivos de carbono han demostrado que el lactato, en vez de la glucosa, es la principal fuente de energía para muchos tejidos salvo para el cerebro. El lactato es transportado en el torrente sanguíneo para suministrar energía en función de la demanda metabólica (Stanley *et al.*, 1985; Mazzeo *et al.*, 1986; Bergman *et al.*, 1999; Hui *et al.*, 2017; Martínez-Reyes y Chandel, 2017).

2. El lactato como precursor gluconeogénico. Se ha descrito que los niveles de lactato regulan la concentración de glucosa en sangre (Bergman *et al.*, 2000; Emhoff *et al.*, 2013; Hui *et al.*, 2017; Martínez-Reyes y Chandel, 2017).

3. El lactato como “lactohormona”. El lactato es una molécula señalizadora autocrina, paracrina y endocrina que participa en la interacción entre órganos, tejidos y células (Brooks, 2002; Hashimoto *et al.*, 2007; Brooks, 2009; Barros, 2013; Nalbandian y Takeda, 2016; Hui *et al.*, 2017).

El lactato sanguíneo actúa como precursor para obtener energía en función de la demanda energética tisular (Hui *et al.*, 2017). Para satisfacer estas necesidades metabólicas se han descrito 2 tipos celulares en función de su metabolismo láctico (Brooks, 2018). Las células productoras de lactato, son aquellas donde predomina el metabolismo glucolítico, producen mayor concentración de lactato y se encargan de exportarlo hacia el espacio extracelular; y las células consumidoras, son aquellas donde predomina el metabolismo oxidativo y utilizan el lactato para obtener energía a nivel mitocondrial, usando la CTE (Brooks, 2018) (Figura 13 B). El flujo de lactato desde las células productoras a las células consumidoras puede ser de manera directa célula-célula o a través del torrente circulatorio (Figura 13 B). El transporte transmembranario de lactato se lleva a cabo gracias a transportadores monocarboxílicos de lactato/ piruvato (MCT), que permiten el paso de lactato a través de las membranas celulares cotransportándolo con un protón (Roth y Brooks, 1990; García *et al.*, 1994; Dubouchaud *et al.*, 2000). El transporte es bidireccional (García *et al.*, 1994; Price *et al.*, 1998), permitiendo a los tejidos elegir entre la liberación y la captación de lactato dependiendo de los niveles de lactato intracelulares, del gradiente de protones y del estado redox de las células (Brook, 2018). Las distintas isoformas de estos transportadores se encuentran en numerosos tipos celulares y tejidos, incluso en el cerebro y pueden intercambiar lactato rápidamente (McClelland *et al.*, 2003; Pellerin *et al.*, 2005; Hashimoto *et al.*, 2008). Hasta la fecha se han caracterizado 4 isoformas: MCT1, MCT2, MCT3 y MCT4. El MCT1, que se expresa mayoritariamente en el corazón y en el músculo esquelético, introduce el ácido láctico en la célula para que actúe como combustible en el metabolismo oxidativo. También se expresa en el hígado y en el riñón donde el lactato actúa como precursor gluconeogénico (McCullagh *et al.*, 1996; Halestrap *et al.*, 1997; Halestrap y Price, 1999). Además, se ha descrito que el MCT1 está presente en la membrana interna mitocondrial para facilitar la unión entre el metabolismo glucolítico y el oxidativo (Hashimoto *et al.*, 2006). MCT2, es el transportador de mayor afinidad (Broer *et al.*, 1999) y puede captar fácilmente el lactato para la gluconeogénesis en el hígado y riñón donde es la

isoforma más expresada en algunas especies (Jackson, 1997; Halestrap y Meredith, 2004). El MCT2 también es el más expresado en neuronas para facilitar la absorción de lactato producido por los astrocitos (Pierre y Pellerin, 2005; Bergersen, 2007). La expresión del transportador MCT3 está limitada a la membrana basal del epitelio pigmentado de la retina y al epitelio del plexo coroideo (Philp *et al.*, 1998; Yoon y Philp, 1998), mientras que el transportador MCT4 se expresa principalmente en células glucolíticas tales como en fibras del músculo liso (Wilson *et al.*, 1998; Kadenbach y Huttemann, 2015), y se induce en otras células bajo condiciones de hipoxia (Ullah *et al.*, 2006).

lanzadera de lactato, unión autocrina, paracrina y endocrina entre el metabolismo glucolítico y oxidativo

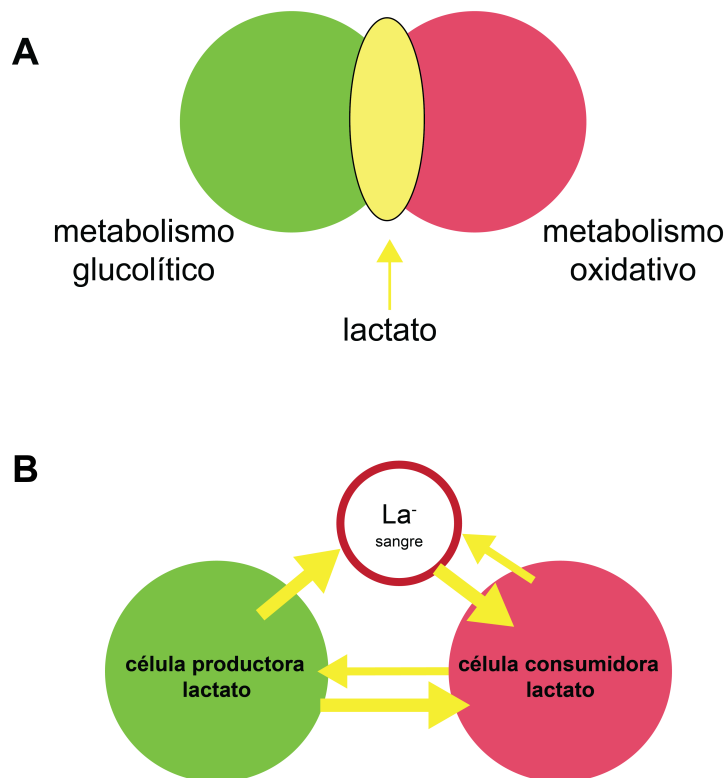


Figura 13. Metabolismo de lactato (A) El lactato como un vehículo de unión entre el metabolismo glucolítico y oxidativo (respiración mitocondrial) que ocurre continuamente bajo condiciones aeróbicas. Las uniones entre las rutas productores y consumidores de lactato existen en numerosas células, tejidos y órganos. Modificado de Brooks, (1984) y Brooks, (2018). (B) Representación de la interacción mediada por lactato entre células. Hay un intercambio de lactato directo o a través del torrente circulatorio entre las células productoras y consumidoras de lactato. Este intercambio depende de la concentración de lactato y del gradiente de protones. Aunque ambos tipos de células llevan a cabo la glucólisis y la fosforilación oxidativa la concentración de lactato es mayor en las células productoras (glucolíticas) que en las consumidoras. Modificado de Brooks, (1984) y Brooks, (2018).

4.2. Lactato y regulación de la respiración

Los parámetros respiratorios varían como un mecanismo de adaptación ante distintos estímulos. El ejercicio y la hipoxia son circunstancias que activan una respuesta hiperventilatoria y en ambos casos hay un incremento de la concentración de lactato en sangre; sin embargo, la PaO₂ es distinta: durante hipoxia hay una disminución de la PaO₂ y en el ejercicio moderado no hay cambios significativos de la PaO₂ si se realiza a nivel del mar. No obstante, se desconoce cuál es la función biológica del incremento de lactato en ambas condiciones y cuál es su contribución a la respuesta hiperventilatoria adaptativa (Lee *et al.*, 1996; Fregosi, 1998; Hardarson *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2015; San-Millan y Brooks, 2018). La mayor dificultad para esclarecer la contribución del lactato a la respuesta hiperventilatoria es separar el efecto de lactato de la acidez láctica o de la hipoxia, ya que tanto una disminución del pH como la disminución de PaO₂ activan el CC que media la respuesta hiperventilatoria. De hecho, se ha descrito que el ácido láctico produce un incremento de la frecuencia ventilatoria en ratas (Lee *et al.*, 1996), pero puede deberse a que la disminución del pH también activa el CC (Eyzaguirre *et al.*, 1965) y los quimiorreceptores centrales, promoviendo la hiperventilación. No obstante, hay circunstancias donde se produce un incremento de lactato sin ir acompañado de una disminución del pH (Zilva, 1978; Ribas, 2010; Brooks, 2018) o de hipoxia (Gladden, 2001; Brooks, 2003; Ribas, 2010). Se ha descrito que el lactato, *per se*, en circunstancias controladas de pH, PaCO₂, PaO₂, produce un aumento de la frecuencia ventilatoria (Hardarson *et al.*, 1998). La detección de lactato podría sumarse a la regulación compensatoria activada durante el ejercicio para promover la hiperventilación (Fregosi, 1998), por lo que consideramos interesante estudiar el efecto de lactato en la activación de CC bajo condiciones de normoxia y controlando el pH extracelular.

4.2.1. Lactato e hipoxia

La concentración de lactato en sangre aumenta durante la hipoxia crónica en condiciones de reposo en individuos que viven en grandes altitudes. Las mayores concentraciones de lactato se obtienen en los primeros minutos de exposición a hipoxia (Reeves *et al.*, 1992). El aumento de la concentración de lactato se debe a que durante los primeros minutos en hipoxia se activa el sistema simpático que facilita su aumento activando la fosforilasa e incrementando la velocidad de las bombas Na⁺-K⁺, que parecen estar unidas a enzimas glucolíticas (LDH) favoreciendo la producción de lactato. Además, la activación del sistema simpático produce vasoconstricción en el hígado, riñones y músculos inactivos disminuyendo el reciclado de lactato (Brooks *et al.*, 1998; Ribas, 2010). A medida que la

Introducción

exposición a hipoxia se hace más crónica, disminuye la respuesta simpática y la concentración de lactato simultáneamente (Brooks *et al.*, 1998). El papel del lactato en la respuesta adaptativa a hipoxia ha sido muy estudiado. Se conoce que el lactato actúa como vasodilatador mejorando el abastecimiento del O₂ a los tejidos antes una lesión (Mori *et al.*, 1998; Trabold *et al.*, 2003), así que es probable que durante hipoxia tenga la misma función. Además, hay estudios que tratan de esclarecer la implicación del lactato en la respuesta respiratoria a hipoxia mediada por el CC sin llegar a resultados concluyentes (Kirsch y D'Alecy, 1983).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis Doctoral ha sido avanzar en el conocimiento del mecanismo de quimiotransducción en respuesta a hipoxia en las células glómicas del CC. Este es un proceso biológico básico cuyo estudio inició nuestro grupo hace 30 años y que en fecha reciente, debido a la generación de un modelo de ratón *knockout* embrionario para la subunidad *Ndufs2* de CMI (ratón TH-NDUFS2), ha progresado notablemente (ver “Introducción”). El modelo de delección embrionaria del gen *Ndufs2* tiene algunas limitaciones metabólicas, por lo que se desarrolló el modelo de *knockout* condicional para la delección del gen *Ndufs2* en el adulto (ratón ESR-NDUFS2). En esta Tesis Doctoral se estudia con detalle la respuesta aguda a la hipoxia por las células del CC en el ratón ESR-NDUFS2. Además, se ha re-analizado el papel del *Olf78* en la respuesta a hipoxia aguda y a lactato. Finalmente, se ha investigado si el CC es capaz de detectar los cambios fisiológicos en los niveles de lactato extracelular.

Los objetivos específicos del trabajo fueron los siguientes:

1. Caracterizar los cambios en la respuesta a hipoxia sistémica y celular en ratones *knockout* ESR-NDUFS2, en paralelo a la disminución gradual de la actividad del CMI tras el tratamiento con TMX.
2. Confirmar que el incremento de NADH y ROS durante hipoxia en células glómicas promueve la activación del CC, y estudiar la importancia del ratio NADH/NAD^+ en la capacidad de responder a hipoxia de las células.
3. Estudiar la importancia de la acumulación de quinona reducida durante la hipoxia en la producción de los agentes señalizadores (NADH y ROS) por el CMI.
4. Comprobar si el receptor olfatorio *Olf78* es esencial para activar el CC durante hipoxia y si dicha molécula es realmente un receptor funcional de lactato.
5. Investigar si el CC se activa por lactato extracelular y la naturaleza de los mecanismos responsables.
6. Estudiar el significado e impacto fisiológico de la activación del CC por lactato.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Generación, mantenimiento y manipulación de los animales de experimentación

1.1. Generación de los diferentes modelos de ratón *knockout*: TH-NDUFS2, ESR-NDUFS2 y Olf78

Para generar las líneas de ratones *knockout* condicionales de la subunidad Ndufs2 del CMI se cruzaron ratones portadores del alelo floxeado (*Ndufs2^{lox}*) con ratones que expresaban la recombinasa CRE (Fernández-Agüera *et al.*, 2015). En concreto, para obtener el modelo Ndufs2/TH/IRES/CRE con delección embrionaria del gen *Ndufs2* en las células catecolaminérgicas (modelo denominado TH-NDUFS2) se usó la recombinasa CRE bajo el promotor del gen *Th* (Lindeberg *et al.*, 2004). Para generar el modelo Ndufs2/CRE/ESR con delección ubicua del gen *Ndufs2* en la vida adulta (modelo denominado ESR-NDUFS2) se utilizaron ratones que expresaban la recombinasa CRE de forma inducible por TMX (Hayashi y McMahon, 2002). El fondo genético de estos modelos de ratones es mixto 129SvJ x C57BL/6.

Para estudiar el efecto del receptor olfatorio Olf78 sobre la regulación de la respiración por oxígeno se utilizaron dos líneas de animales que procedían de distinto origen (ver abajo). Las líneas de ratones fueron expandidas con una separación cronológica, (años 2016 y 2017) y estabuladas en distintos animalarios evitando cualquier posible interacción entre ellas. La primera línea de ratones *knockout* para el gen *Olf78*, B6;129P2-Olf78^{tm1Mom}/MomJ, fue comprada a “The Jackson Laboratory” por el laboratorio de Dr. Mombaerts en Frankfurt (Alemania). Estos ratones se obtuvieron a partir ovocitos C57BL/6J fertilizados con espermias criogenizado. El alelo *Olf78^{tm1Mom1}* fue publicado originalmente como GFP→MOR18-2-IRES-*taulacZ*, abreviado como Δ 18-2 (Bozza *et al.*, 2009), y renombrado como mutante Olf78 (Chang *et al.*, 2018). El fondo genético de estos animales es mixto 129P2/OlaHsd x C57BL/6J. Los ratones *knockout* para este gen, *Olf78*, no fueron distinguibles fenotípicamente de los ratones con genotipo silvestre. La descendencia heterocigótica, obtenida en el laboratorio de Frankfurt al cruzar ratones *knockout* Olf78 con ratones silvestres C57BL/6J, fue enviada a nuestro laboratorio de Sevilla para expandir la línea (modelo denominado Olf78 “FRA”). La segunda línea de ratones se obtuvo del cruce de dos parejas de ratones Olf78 heterocigotos, de dos meses de edad, que se obtuvieron de “The Jackson Laboratory”. Estos ratones procedían del mismo espermia criopreservado que los explicados anteriormente, pero se enviaron a Sevilla directamente, sin pasar por Frankfurt,

(modelo denominado Oflr78 “JAX”). Las parejas tuvieron descendencia sana un mes después de su llegada. Los ratones mutantes para *Oflr78* aparecieron en las camadas en proporción mendeliana y no presentaron ningún rasgo que los distinguiera de los controles. Los genotipos no se correlacionaron con el color del pelaje de los ratones. Las parejas reproductoras originales generaron ocho camadas durante cinco meses; posteriormente, otras parejas de ratones heterocigotos los reemplazaron para continuar con la reproducción. Solo se estudiaron los ratones JAX F2 y F3 de tipo salvaje (+/+) y *knockout* para *Oflr78* (-/-).

1.2. Mantenimiento y tratamiento de los modelos de ratones *knockout*

Los ratones se estabularon en condiciones de libre acceso a agua y comida, a una temperatura constante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y con un ciclo alternante de 12 horas de luz/oscuridad. Los animales de las líneas TH-NDUFS2 y *Oflr78* se sacrificaron y utilizaron para experimentación cuando tenían dos meses de edad. Sin embargo, los ratones de la línea ESR-NDUFS2 se sacrificaron cuando tenían cuatro meses aproximadamente, ya que a los dos meses se trataron durante un mes con una dieta especial con 400 mg/Kg de TMX (CRD TAM400/CreER Irradiated, *Teklad Laboratory*) para eliminar la expresión del gen *Ndufs2*. Tras el tratamiento con TMX los ratones se alimentaron con la dieta habitual hasta su sacrificio 3 o 4 semanas más tarde (EXP, Figura 14). Para sacrificar los animales se usó una sobredosis de tiopental sódico (120-150 mg/Kg) vía intraperitoneal. Todos los experimentos realizados con animales en esta Tesis Doctoral siguieron la directiva de la Comunidad Europea (Directive 2010/63/EU), así como la legislación española (R.D. 53/2013 BOE 34/11370-421) y fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla.

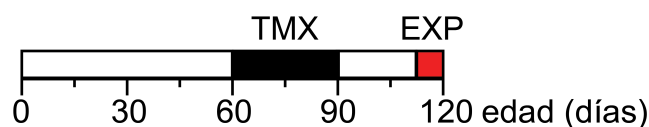


Figura 14. Tratamiento de los ratones ESR-NDUFS2. Diseño experimental empleado para generar la línea de ratones ESR-NDUFS2. Tratamiento con dieta de tamoxifeno (TMX; negro); realización de experimentos y sacrificio (EXP; rojo).

1.3. Experimentos realizados en animales *in vivo*

1.3.1. Medida de la concentración de lactato en sangre

Las concentraciones de lactato en sangre fueron determinadas con el *kit Lactate plus (Nova Biomedical)* que dispone de unas tiras reactivas, de un solo uso, que miden la concentración de lactato en una gota de sangre. En nuestros estudios, la gota de sangre utilizada para medir la concentración de lactato fue obtenida tras pinchar, con una aguja de insulina, en la cola de los ratones. Para comparar la concentración de lactato entre una condición de normoxia (21 % de O₂) y a distintos niveles de hipoxia aguda (leve: 15% O₂ o severa: 10% de O₂) se utilizó una cámara de hipoxia (*COY Laboratory Products*) donde se introdujeron las jaulas con los ratones y se hicieron las medidas dentro de ella. Los niveles de O₂ y CO₂ de la cámara fueron controlados y monitorizados durante los experimentos. Las medidas se realizaron siguiendo siempre el mismo protocolo que se describe a continuación. Primero se registraron los niveles de lactato en situación control (normoxia), en la que los ratones respiraban aire con 21% de O₂; posteriormente se midió la [lactato] una vez que los animales habían sido expuestos a una situación de hipoxia aguda leve (15% de O₂) o severa (10% de O₂) durante 5-10 min. Por último, se midió la [lactato] tras pasar 5-10 min desde que los ratones salieron de la cámara de hipoxia (a esta condición la llamaremos recuperación). El diseño experimental está esquematizado en la Figura 15.

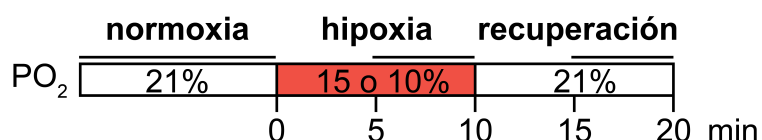


Figura 15. Diseño experimental de la medida de la concentración de lactato en sangre. Diseño experimental para medir la concentración de lactato en sangre en las condiciones de normoxia, hipoxia (rojo) y recuperación. Las líneas horizontales indican los momentos de medida de lactato.

1.3.2. Medida de la función respiratoria mediante pletismografía

El registro de los cambios de parámetros respiratorios en animal completo en respuesta a hipoxia e hipercapnia se realizó mediante la técnica de pletismografía. Para ello, se utilizó un pletismógrafo con cámaras herméticamente selladas de metacrilato, de volumen constante, donde se introdujeron los animales no anestesiados (*EMKA Technologies*). Las distintas mezclas de gases utilizadas fueron: normoxia (21% O₂, 0,04% CO₂ y 78,96% de N₂), hipoxia (10% O₂, 0,04% CO₂, and 89,96% N₂) e hipercapnia (21% O₂, 5% CO₂ y 74% de N₂). El equipo pletismógrafo consta de un sistema de tubos que permite el suministro constante y controlado (flujo entrada 1 L/min) de los distintos gases a las cámaras de registros. Estas

Materiales y Métodos

cámaras están selladas salvo por un pequeño orificio de fuga, necesario para permitir la salida de gases a un flujo idéntico al de entrada (flujo salida 1 L/min) y evitar de esta forma cambios de presión dentro de la cámara de plestismografía. Las cámaras tienen acoplados sensores, que son capaces de medir pequeños cambios de presión que se producen en su interior causados por movimientos o por la respiración de los animales. Los datos de presión recogidos por estos sensores son enviados al amplificador y este produce una señal de flujo (mL/s; ver panel de la derecha de la Figura 16). La frecuencia de muestreo de los cambios de presión fue de 500 Hz. Se utilizó el *software* de análisis del programa iox2 (EMKA Technologies) para obtener los diferentes parámetros respiratorios a partir del registro del flujo y se almacenaron en una tabla los valores, tomándose un valor cada 2s. Además, una de las cámara tiene acoplados sensores de concentración de O₂ y CO₂ (oxy 3690 MP, GHM Messtechnik, y NS:MCO, Cibertec) que mandan la señal obtenida, con una frecuencia de muestreo de 10000 Hz, al amplificador y luego estas señales son digitalizadas y grabadas, sin filtrar. Solo se almacenó un valor de O₂ y CO₂ cada 2 segundos (Figura 16).

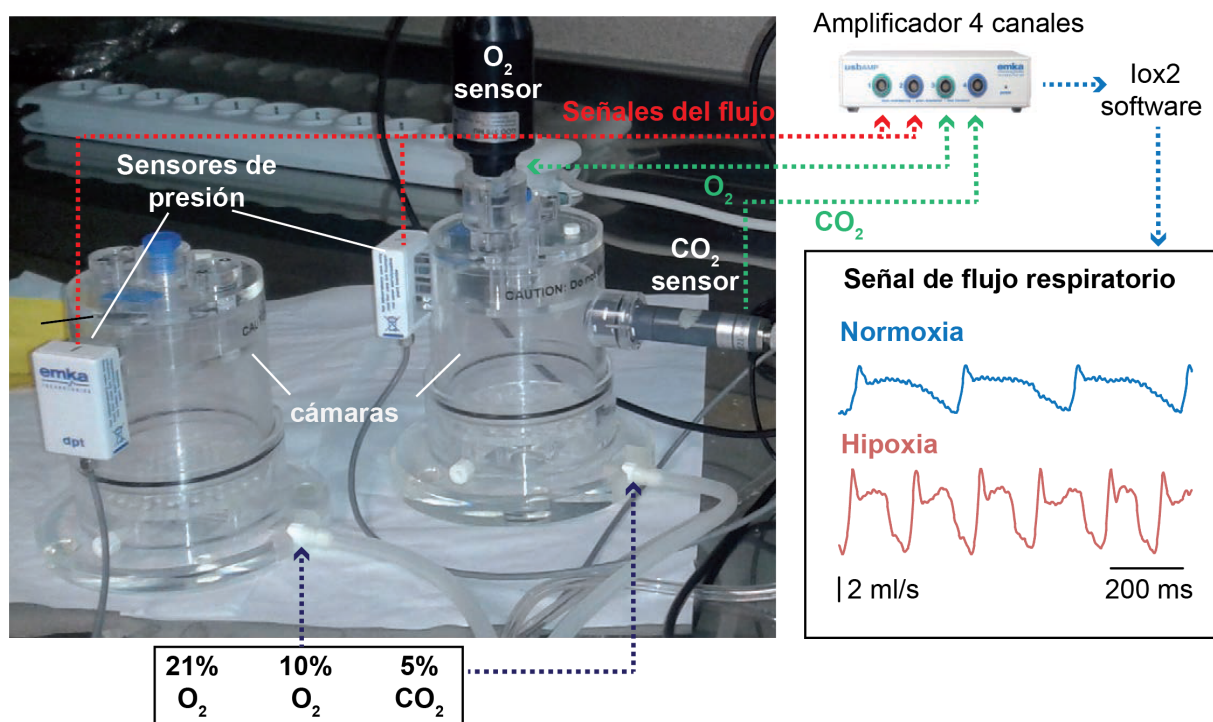


Figura 16. Equipamiento de plestismografía. La imagen ilustra las dos cámaras de registro usadas para realizar una plestismografía de animal completo. Las cámaras están conectadas por tubos a las mezclas de los distintos gases y cada una tiene un sensor de presión independiente. Las concentraciones de O₂ y CO₂ son monitorizadas por sensores conectados a una de las cámaras. Los datos recogidos por estos sensores son digitalizados gracias al programa iox2. Modificado de Ortega-Sáenz *et al.*, (2018).

El protocolo experimental al que fueron sometidos los diferentes animales se ilustra en

Materiales y Métodos

la Figura 17 y constaba de dos ciclos de normoxia/hipoxia, en los que la hipoxia se mantuvo durante 5 minutos al 10% O₂ (trazo azul, Figura 17), seguidos de un ciclo de hipercapnia donde se mantuvo 1 min la concentración de CO₂ al 5% (trazo rojo, Figura 17). Los valores de frecuencia respiratoria obtenidos en las distintas condiciones experimentales se muestran en el panel superior de la Figura 17 (punteado azul, Figura 17). Para cuantificar la frecuencia respiratoria basal (en normoxia) se tomaron todos los puntos registrados 5 minutos antes de la exposición a hipoxia o a hipercapnia y 5 minutos tras la recuperación. Para cuantificar la frecuencia respiratoria en hipoxia se tomaron los puntos registrados durante los 5 minutos que el animal estuvo expuesto a 10% O₂. Por último, para cuantificar la frecuencia respiratoria en hipercapnia se tomaron los puntos registrados durante el minuto que el animal estuvo expuesto a 4-5 % CO₂. El *software* iox2 incluye un sistema automático para diferenciar entre los cambios de presión debidos a la respiración rítmica y los relacionados con el movimiento irregular de los animales como olfatear, suspirar, etc. La tasa de éxito se obtiene del análisis de un número determinado de respiraciones consecutivas, si todas ellas tienen una cinética similar se obtiene una tasa de éxito del 100%, cuanto menos parecidas sean, menor es la tasa de éxito y más probabilidad es que sean debidas a movimientos del animal. En nuestro laboratorio solo utilizamos para analizar los datos obtenidos con una tasa de éxito del 100%.

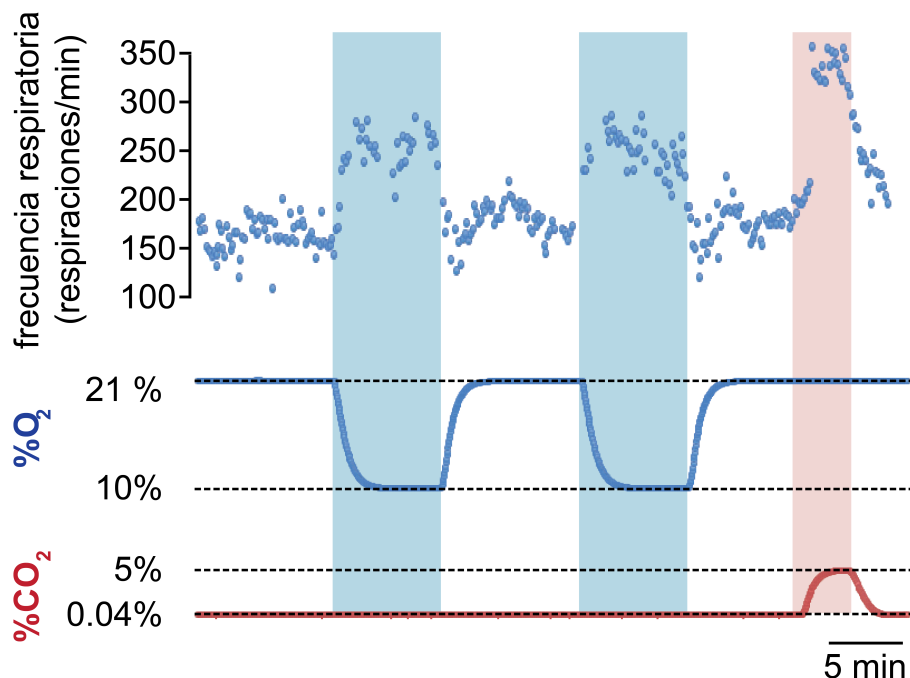


Figura 17. Incremento de la frecuencia respiratoria de un animal control en respuesta a hipoxia e hipercapnia. Registro representativo de cómo aumenta la frecuencia respiratoria de un animal cuando disminuye la presión de O₂ desde 21% hasta 10% (trazo azul) o cuando se aumenta la concentración de CO₂ desde 0,04% hasta 5% (trazo rojo).

2. Preparaciones celulares

Tras el sacrificio de los ratones se extrajeron las bifurcaciones de las arterias carótidas y se disecaron los CC, los cuales se procesaron de forma diferente en función del tipo de experimento a realizar. En esta Tesis Doctoral se utilizaron rodajas de CC para registrar por amperometría la actividad secretora en respuesta a distintos estímulos, así como para la medida de la producción de ROS. Las células dispersas se utilizaron para las medidas microfluorimétricas así como para los registros de corrientes iónicas y potencial de membrana con la técnica de *patch clamp*.

2.1. Rodajas de cuerpo carotídeo

Las rodajas de CC se realizaron siguiendo el procedimiento previamente descrito (Pardal *et al.*, 2000; Piruat *et al.*, 2004; Ortega-Sáenz *et al.*, 2018). Tras sacrificar a los animales se extrajeron las bifurcaciones y se diseccionaron los CC en una solución fría de Tyrode 0 calcio (148 mM NaCl, 2 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucosa, pH 7.4). Los CC se incluyeron en agarosa de bajo punto de fusión (*SeaKem GTG, Lonza*) al 1% en PBS a una temperatura de 42 °C, se solidificó el bloque de agarosa en hielo, se pegaron en la cámara del vibratomo (VT 1200S, Leica) y se cubrieron con solución Tyrode 0 calcio para cortar los CC en rodajas de 150 µm de grosor. Las rodajas se incubaron durante 5 minutos en el baño a 37 °C con agitación suave en 3 ml de solución enzimática (0,27 mg/ml de tripsina I (*Sigma*), 0,6 mg/ml de colagenasa tipo II (*Sigma*), 1,25 U/ml de elastasa porcina (*Calbiochem*) y 0,05 mM de CaCl₂ en PBS a pH 7,4). A continuación, se retiró la solución de enzimática, se lavaron las rodajas 2 veces con PBS frío, se añadieron 2 ml de medio de cultivo completo (30% DMEM/F12 sin glutamina y 60% DMEM sin glucosa, ni piruvato sódico) (*Gibco*), 10% FBS (*Biowhittaker*), penicilina (100U/ml) /estreptomicina (10µg/ml) (*Biowhittaker*), 2 mM L-glutamina (*Biowhittaker*), 84 U/L insulina (*Actrapid*), eritropoyetina (0,2 U/ml) y se incubaron a 37°C y 5% CO₂. Las rodajas se registraron desde las 24h después de terminado el cultivo.

2.2. Células dispersas de cuerpo carotídeo

Las células del CC se dispersaron siguiendo el procedimiento descrito detalladamente en el capítulo metodológico de Muñoz-Cabello *et al.*, (2018). Se extrajeron los CC y se incubaron en 3 ml de solución enzimática (ver “apartado 2.1”) durante 20 minutos en el incubador a 37°C y 5% CO₂ para llevar a cabo la digestión enzimática. A continuación, los CC se estiraron mecánicamente en el microscopio con 2 agujas estériles para ayudar a la

disgregación del tejido y se incubaron en las mismas condiciones durante 5 minutos más. Para parar la reacción enzimática se añadió medio de cultivo completo (ver “apartado 2.1”). Se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos y el *pellet* obtenido se resuspendió en medio completo. Se sembraron las células sobre cubres tratados con poli-L-lisina (*Sigma*). El medio de cultivo utilizado para las células dispersas es el mismo que el descrito para las rodajas (ver “apartado 2.1”) pero sin añadir EPO. Las células dispersas se incubaron a 37 °C y 5% CO₂ y se registraron al día siguiente.

3. Técnicas bioquímicas y de biología molecular *in vitro*

Tras el sacrificio de los ratones los tejidos de interés se extrajeron, se congelaron en N₂ líquido y se almacenaron a -80°C en los casos que fue necesario. Estos tejidos se utilizaron posteriormente para llevar a cabo experimentos con técnicas de bioquímica y biología molecular.

3.1. Medición de la actividad del complejo I mitocondrial

El ensayo de la actividad del CMI, de los ratones de experimentación, se llevó a cabo en mitocondrias aisladas del riñón. La extracción y medición de la actividad del CMI en un espectrofotómetro se basó en procedimientos previamente descritos (Birch-Machin y Turnbull, 2001; Fernández-Vizorra *et al.*, 2002; Díaz-Castro *et al.*, 2012). Las mitocondrias se congelaron y descongelaron rápidamente 3 veces pasándolas de N₂ líquido a un baño a 30 °C para fragmentar las mitocondrias y hacer accesibles los complejos de la CTE. La medida de la actividad del CMI se basa en la reducción de la absorbancia del NADH al ser oxidado a NAD⁺ por el CMI. En este ensayo se emplearon 10-20 µg de extracto mitocondrial y se llevó a cabo a 30 °C en presencia de ubiquinona 0,13 mM (*Sigma*), NADH 0,13 mM (*Roche*) y antimicina A 3,6 µM (*Sigma*). La absorbancia se midió cada 10 segundos, durante 2 minutos, a 340 nm de longitud de onda en el espectrofotómetro (DU730, *BeckmanCoulter*). A continuación, se añadió rotenona 5 µM (*Sigma*) y se volvió a medir. La actividad del CMI se determinó a partir de la diferencia en la tasa de disminución de la absorbancia de NADH antes y después de la adición de rotenona. La actividad de CMI se normalizó con la cantidad de proteína, determinada mediante un ensayo de Bradford (*Bio-Rad*).

3.2. PCR estándar

El genotipado de los ratones se realizó mediante PCR convencional a partir de una muestra de tejido de deditos recogidos a los 10 días postnatales. Se extrajo ADN genómico de

Materiales y Métodos

esta muestra mediante digestión con 150 µl de tampón “*PCR Direct*” (*Viagen Biotech*) y 0,3 µg/µl de proteinasa K durante 2 h 45 min a 800 rpm y 57°C. Se inactivó la proteinasa K durante 45 min a 85°C.

Para identificar los alelos *Ndufs2*⁺ (143 pb), y *Ndufs2*^{fl^{ox}} (355 pb) se amplificaron secuencias específicas con los cebadores Fx51 y Fx31 y el alelo *Ndufs2*⁻ (550 pb) con Fx51 y FRT1. Las mezclas de la reacción para las distintas PCRs fueron las siguientes: para los alelos *Ndufs2*⁺ y *Ndufs2*^{fl^{ox}} las mezclas contenían 2 µl de ADN molde, 10 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de los cebadores específicos y 9 µl de la mezcla *Dream taq* (*DreamTaq Green PCR Master Mix* (2X)). La mezcla de la reacción para la PCR de alelo *Ndufs2*⁻ contenían 2 µl de ADN molde, 5 µl de tampón 10x, MgCl₂ 2,5 mM, 0,2 mM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 38,7 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de los cebadores específicos y 1,5 U de la Taq polimerasa (*Bioline*).

El gen de la recombinasa *Cre* expresado bajo el promotor del gen *Th* se amplificó con los cebadores TH3', TH5' y Cre UD, la ausencia de esta recombinasa amplificaba una banda de 300 pb y la presencia de 400 pb. El gen de la recombinasa *Cre* se amplificó con los cebadores Cre lo y Cre up, la presencia de esta recombinasa tenía un valor de 750 pb. Las mezclas de la reacción para las distintas PCRs contenían 2 µl de ADN molde, 10 µl de agua libre de nucleasas, 1 µl de los cebadores específicos para cada una de ellas y 9 µl de la mezcla *Dream taq* (*DreamTaq Green PCR Master Mix* (2X)).

Los alelos *Olfir78*⁺ (673 pb) y *Olfir78*^{tm1Momi} (670 pb) se amplificaron con los cebadores SF7, SF8 y SF4, SF8, respectivamente. Para confirmar la presencia del alelo *Olfir78*^{tm1Momi} se llevó a cabo el genotipado de la proteína GFP con los cebadores M1345, M1346 y M1343. Con M1345 y M1346 se amplificó la ausencia *GFP* (494 pb) y con M1345 y M1343 se amplificó la sobreexpresión de *GFP* (388 pb). Las mezclas de las PCRs contenían 2 µl de ADN, 7 µl de agua libre de nucleasas, 0,5 µl de los cebadores específicos y 15 µl de la mezcla *Dream taq* (*DreamTaq Green PCR Master Mix* (2X)). El stock de todos los cebadores específicos es de 20 µM, sus secuencias se muestran en la siguiente tabla.

Nombre	Secuencia (5'-3')
Fx51	ATAAGAGTGGATAGGATGTTT
Fx31	CATTTCTCCCTTCCCGTC
FRT1	AGTGGCAGAACAATAGAGTGATCCAGGG
TH-3'	CTTTCCTTCCTTTATTGAGAT
TH-5'	CACCCTGACCCAAGCACT
Cre UD	GATACCTGGCCTGGTCTG
Cre lo	ACGGGCACTGTGTCCAG
Cre up	TGTTTCAGGGATCGCCAG
SF7	CTCATTGGTCTGTCAGTGG
SF8	GATACACATAAGCCTTCCTG
SF4	TGGAGCCCGTCAGTATCGGC
M1345	GGGAGCGCCTAGTATCCAGAC
M1346	TCTTGGGCATTGTGGATGTGG
M1343	GGTCAGCTTGCCGTAGGTGG

Tabla 1. Secuencia de los cebadores empleados para el genotipado de los ratones por PCR.

3.3. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa

Para extraer ARN, se homogeneizó el CC, el GCS y la MA con el politrón (*Pro Scientific*) y se empleó el *kit RNeasy micro (Qiagen)*. El ARN obtenido se cuantificó en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*). Para el análisis de la expresión génica en CC, dado su pequeño tamaño, fue necesario agrupar los CC de 3-4 ratones como una sola muestra y realizar una preamplificación previa a la retrotranscripción. Para ello se empleó el *WT Expression kit (Ambion)* según el manual del fabricante. Se retrotranscribieron 0,5 µg de ARN con el *QuantiTec Reverse Transcription kit (Qiagen)*, según el protocolo del fabricante, para obtener ADNc. Las reacciones de PCR cuantitativa de CC, GCS y MA se realizaron con 20 µl de ADNc. Se emplearon el reactivo *TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems)* y sondas TaqMan (*Applied Biosystems*) para la amplificación del ADNc de interés. Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador *7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. El nivel de expresión del gen de estudio se analizó mediante cuantificación relativa ($\Delta\Delta Ct$) empleando el gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*) como gen *housekeeping*.

4. Inmunohistoquímica de fluorescencia en rodajas de cuerpo carotídeo

Las rodajas de los ratones Olfr78, registradas previamente con amperometría, se fijaron durante 20 minutos con paraformaldehído (PFA) 4% en PBS, pH 7,4 (*Sigma*) y posteriormente se almacenaron a 4°C en una solución de azida sódica al 0,5% en PBS. Las rodajas se permeabilizaron en PBS con Tritón 0,1% (Tritón X100 0,1% (*Sigma*) en PBS) y se

incubaron con solución de bloqueo (suero fetal bovino (FBS) 10% y BSA 1mg/ml en PBS-Tritón 0,1%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para detectar la proteína TH se incubó con el anticuerpo policlonal de tirosina hidroxilasa (TH) (conejo anti-TH, *Novus Biologicals*, 1:2500) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, para detectar la presencia de la proteína GFP se incubó con el anticuerpo anti-GFP (conejo IgG anti-GFP, *Aves Labs*, 1:500). La señal se detectó utilizando el anticuerpo secundario fluorescente Alexa568 (anti-conejo, *Invitrogen*, 1:500). Finalmente, los núcleos se tiñeron con DAPI 1 µg/ml en PBS durante 10 minutos (*Sigma*, 1:1000). Para sellar las rodajas se utilizó medio de fluorescencia (*Dako*).

5. Experimentos funcionales *in vitro*

Tras la preparación de las rodajas de CC o de las células glómicas aisladas se llevó a cabo el estudio *in vitro* del CC con distintas técnicas de registros electrofisiológicas y microfluorimétricas.

5.1. Técnicas electrofisiológicas

5.1.1. Técnica de amperometría

La técnica de amperometría permite registrar la actividad secretora de las células mediante el uso de un electrodo de fibra de carbono polarizado al potencial de oxidoreducción de la molécula que se desea detectar. Con esta técnica, se registraron las catecolaminas (especialmente dopamina) liberada por las células glómicas en rodajas de CC expuestas a diferentes estímulos como hipoxia, hipercapnia, lactato y alto potasio (ver apartado 6 “Soluciones de registro”).

- **Equipamiento de registro de amperometría**

La fibra de carbono se fabricó con una fibra sintética de grafito, de 10 µm de diámetro (AMOCO), que se insertó en un tubo de polietileno (*Portex*) y el extremo del tubo se calentó para fundirlo con la fibra de carbono y conseguir su aislamiento eléctrico. El otro extremo del tubo de polietileno se insertó en un capilar de vidrio (*Kimax-51, Kimble products*) y esta unión se selló con *Sylgard (Sigma)*. El capilar de vidrio permite la conexión de la fibra con el electrodo de plata del *head-stage* del amplificador. Antes de comenzar el registro, el electrodo con la fibra, se rellenó con una solución 3M KCl para permitir la conducción de la corriente entre la fibra y el electrodo de plata del *head-stage*. Para detectar la liberación de dopamina

de las células glómicas en las rodajas del CC ante distintos estímulos, la fibra se polarizó a un voltaje de +750 mV, que es el valor de potencial al cual se produce la oxidación de la dopamina. La polarización de la fibra se llevó a cabo mediante un generador de voltaje (*npi Electronics*, GMBH) conectado al amplificador (EPC-8, *HEKA Electronics*). Los electrones liberados por la oxidación de la dopamina, al entrar en contacto con la fibra de carbono, son transferidos a esta y generan una corriente que fluye por el electrodo hacia el preamplificador o *head-stage* donde es amplificada mediante un amplificador operacional configurado como convertidor corriente/voltaje. Esta señal se filtró con un filtro de paso bajo con una frecuencia de corte de 100 Hz y se digitalizó mediante un convertidor analógico-digital (ITC-16, *Instrutech Corporation*). Los datos se adquirieron con el programa *Pulse 8* (*HEKA Electronics*) y se analizaron con el programa Igor Pro (*WaveMetrics*) (Figura 18 A). La corriente generada por la oxidación de toda la dopamina liberada tras la fusión de una única vesícula da lugar a una espiga amperométrica (Figura 18 B y C). La magnitud de la corriente generada es proporcional al número de moléculas oxidadas definidas por la siguiente ecuación:

$$\int I_t dt = Q = n F N$$

Donde I_t es la corriente y Q es la carga (calculada como la integral en el tiempo de la corriente amperométrica) a la superficie del electrodo sensor; n es el número de electrones transferidos por cada molécula oxidada (por ejemplo, 2 electrones en el caso de la dopamina), F es la constante de Faraday (96.500 culombios/mol) y N es el número de moles del neurotransmisor oxidado.

- **Análisis de la señal amperométrica**

Para cuantificar la respuesta secretora inducida por distintos estímulos, se calcularon distintos parámetros utilizando el programa Igor Pro Carbon (*WaveMetrics*). La tasa de secreción (fentocoulombios (fC)/ min) se calculó sumando la carga de todas las espigas amperométricas registradas durante el último minuto de exposición al estímulo. La frecuencia de espigas es el número de espigas evocadas durante el último minuto de la exposición al estímulo. La secreción acumulada (en picocoulombios (pC)) se calculó como la suma de la integral en el tiempo de espigas sucesivas (señal verde en la Figura 19). También se calculó el porcentaje de células que respondieron a cada estímulo. Para ello, sólo se incluyeron aquellas

células que respondieron a alto potasio y se consideró que una célula respondía al estímulo si su secreción aumentó al menos el doble de la secreción basal.

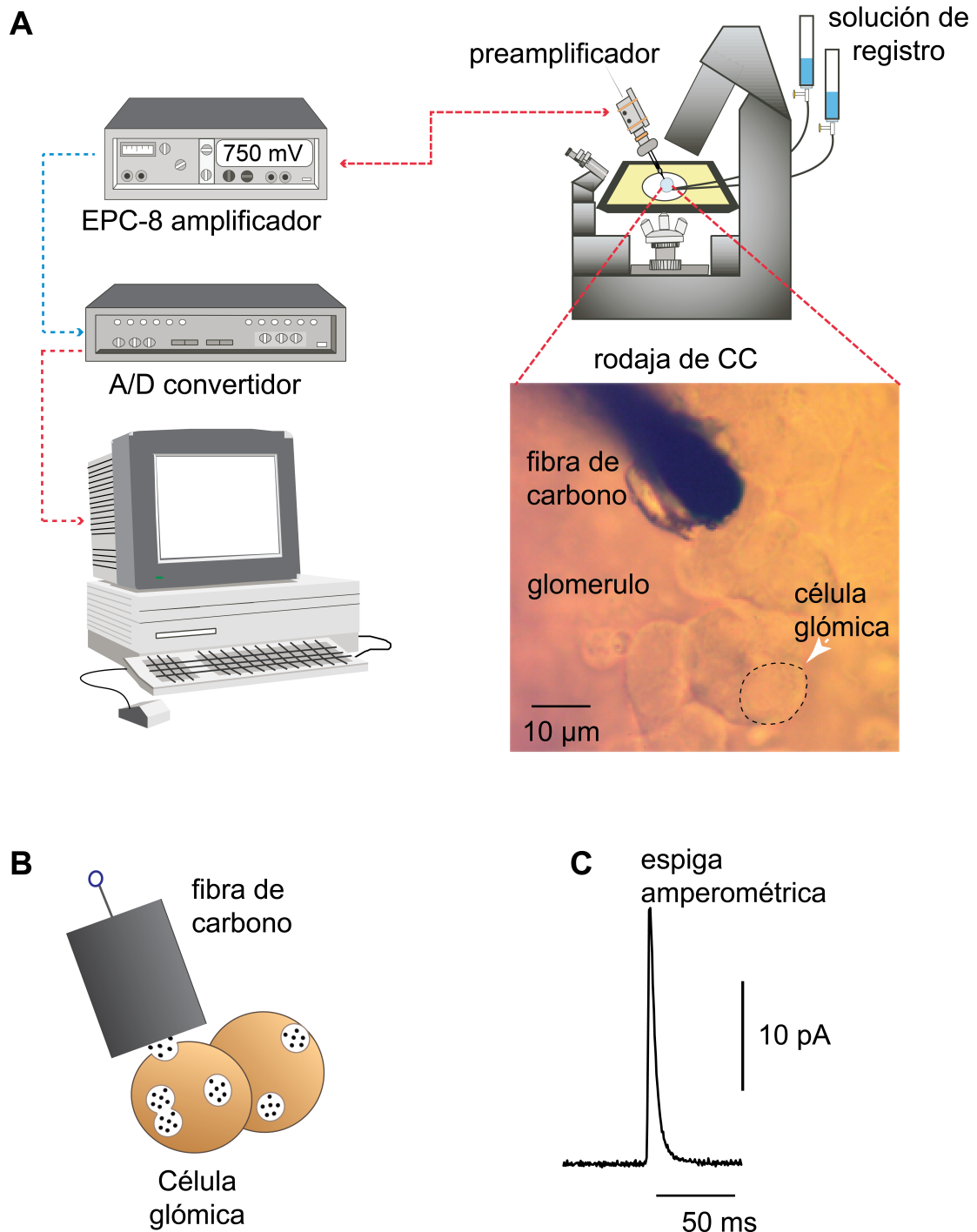


Figura 18. Equipamiento de amperometría. (A) Esquema representativo del equipamiento de amperometría. La fotografía bajo el microscopio muestra el electrodo con la fibra de carbono posicionada cerca de las células glómicas del CC. (B) Dibujo esquemático de la liberación de dopamina de una célula glómica registrada con la técnica de amperometría. (C) Espiga amperométrica registrada como resultado de la fusión de una vesícula. Figura modificada de Ortega-Sáenz *et al.*, (2018).

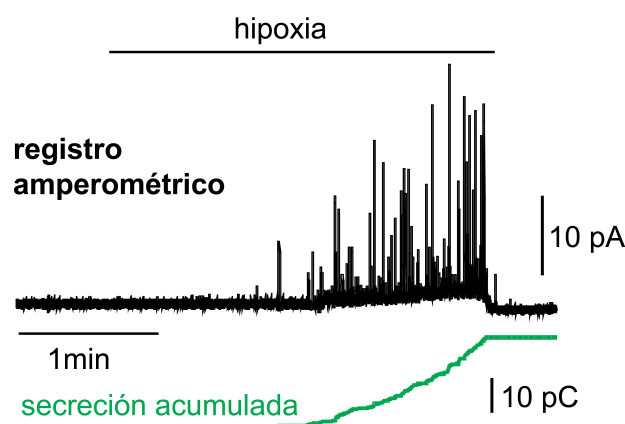


Figura 19. Actividad secretora típica de una célula del cuerpo carotídeo ante un estímulo hipóxico. En el panel inferior se muestra en verde la secreción acumulada.

5.1.2. Técnica de *patch-clamp*

Para caracterizar las propiedades electrofisiológicas de las células glómicas aisladas se utilizó la técnica de *patch-clamp* adaptada a nuestro laboratorio (Hamill *et al.*, 1981; Ganformina y López-Barneo, 1991; Ortega-Sáenz *et al.*, 2010; Fernández-Agüera *et al.*, 2015; Muñoz-Cabello *et al.*, 2018). Esta técnica consiste en establecer una unión de alta resistencia, del orden de gigaohmios, entre la punta de una micropipeta de vidrio y la membrana de la célula. De esta forma se puede controlar el potencial de la membrana plasmática y registrar los cambios en las corrientes iónicas (modo *voltage-clamp*) o bien, registrar los cambios producidos en el potencial de membrana (V_m) generados al aplicar distintos estímulos (modo *current-clamp*). Las distintas configuraciones de la técnica de *patch-clamp* están descritas en numerosas publicaciones previas (Hamill *et al.*, 1981; Muñoz-Cabello *et al.*, 2018; Ortega-Sáenz *et al.*, 2018). En el presente trabajo se utilizaron las configuraciones de *whole-cell* y de parche perforado. En la primera, una vez formado el sello de alta resistencia, se aplicó un pulso de succión para romper el parche de membrana celular en contacto con la micropipeta. De esta forma se accedió al interior de la célula, que se dializó con la solución interna contenida en la micropipeta de registro, que es distinta en función del tipo de corriente macroscópica que se quiera registrar (ver Tabla 3 A en el apartado 6). En la configuración de parche perforado se añadió Anfotericina B a la solución interna. Esta sustancia es un ionóforo capaz de abrir poros en el parche de membrana por el que pasan los iones, el agua y moléculas de diámetro menor a ~ 200 Da (Linley, 2013), evitando la diálisis de macromoléculas citosólicas. La receta para obtener la solución interna más Anfotericina B se muestra en el apartado 6 “Tabla 3 A”. Además de variar la composición de la solución interna según la configuración y el tipo de corriente, también hay que modificar las soluciones

externas en función de la corriente electrofisiológica que se quiera registrar (ver tabla 3B en el apartado 6).

- **Equipamiento de registro de *patch-clamp***

Para el registro con la técnica de *patch-clamp* se utilizaron micropipetas de 2 a 4 M Ω que fueron preparadas con un estirador de pipetas horizontal (*Sutter instruments* modelo P-1000) y sus puntas fueron pulidas con una microforga MF-830 (*Narishige*). Los experimentos se registraron utilizando el mismo microscopio invertido (*Axiovert 35, Zeiss*) equipado con objetivos de 40x/0,60 NA (*PlanFluoR*) y con una lámpara de xenón de 150 W como fuente de excitación. La señal del registro obtenida fue amplificada con un amplificador EPC-7 (*HEKA Elektronik*), filtrada (3-10 KHz dependiendo del experimento) y digitalizada a diferentes frecuencias según el experimento con un convertidor de corriente analógico/digital (*ITC-16 Instrutech Corporation*). Finalmente, la señal fue enviada a un ordenador donde se procesaron los datos de adquisición con un programa llamado *Pulse* (*HEKA Elektronik*). Los registros fueron analizados con los programas *Igor Pro Carbon* (*Wavemetrics*) y *Pulsefit* (*HEKA Elektronik*) (Figura 20).

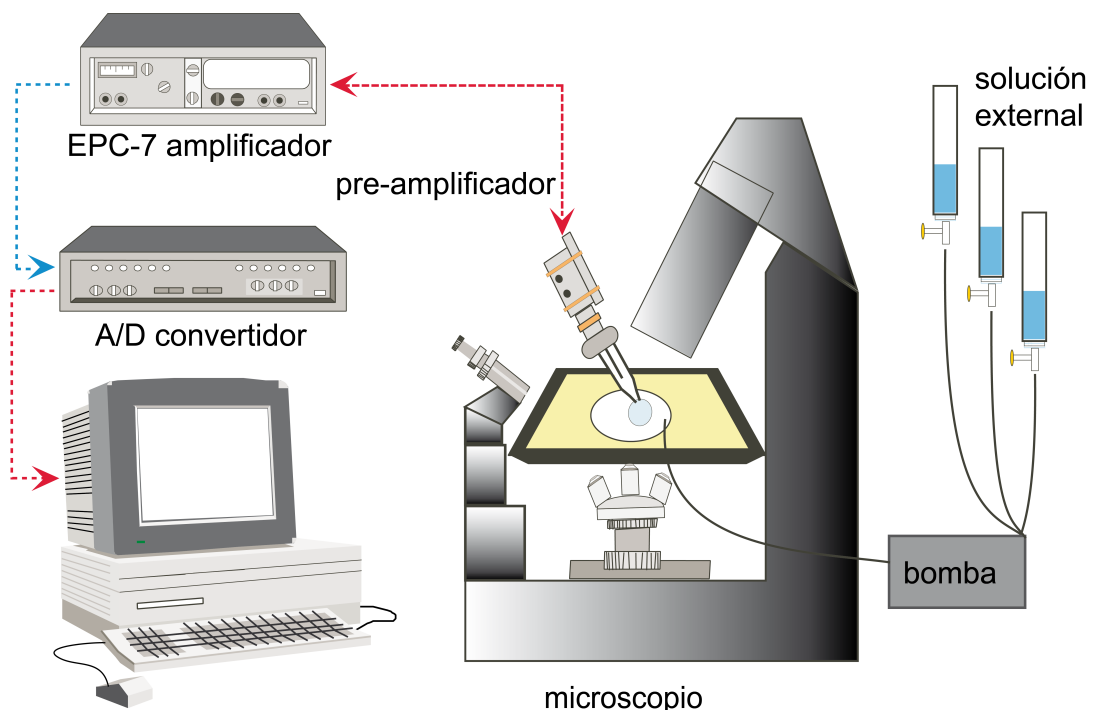


Figura 20. Equipamiento de *patch-clamp*. Esquema representativo del equipamiento del equipamiento de *patch-clamp* para registrar células glómicas aisladas. Figura modificada de Muñoz-Cabello *et al.*, (2018).

- **Medida de las corrientes iónicas mediante *voltage-clamp***

El modo de *voltage-clamp* permite fijar el potencial de la membrana plasmática y registrar el paso de iones tanto a través de los canales voltajes-dependientes como a través de canales no dependientes de voltaje, también llamados canales de fuga. En el modo de *voltage-clamp* se llevaron a cabo diferentes protocolos experimentales. En la configuración de *whole-cell*, se realizaron registros de corrientes iónicas a través canales voltaje-dependientes mediante la aplicación de pulsos despolarizantes de diferente duración. En la configuración de parche perforado, se aplicaron protocolos de rampa para registrar la variación de la corriente a diferentes potenciales, permitiendo analizar tanto los canales de fuga como los canales voltaje-dependientes. Para el registro de las corrientes macroscópicas de calcio y sodio se realizó el sello con la solución externa de bicarbonato y luego se pasó a la que correspondía para el registro de dichas corrientes (solución externa para I_{Na} e I_{Ca} . Tabla 3B) debido a que el sello no se pudo hacer bien con la solución externa de HEPES.

- **Medida del potencial de membrana mediante *current-clamp***

Los cambios en el potencial de membrana se registraron mediante la configuración de fijación de corriente (*current-clamp*) de la técnica de *patch-clamp*. Dichos experimentos se llevaron a cabo en la configuración de parche perforado. Las soluciones internas y externas se muestran en las tablas 3A y 3B respectivamente.

- **Análisis de la señal de *patch-clamp***

Los datos de voltaje o corriente registrados con las técnicas de *current-clamp* o *voltage-clamp*, respectivamente, fueron analizados para caracterizar las propiedades electrofisiológicas de las células glómicas de distintos modelos de ratón o bajo distintas condiciones.

Con la técnica de parche perforado en la configuración de *current-clamp* se registró la despolarización cuando las células glómicas aisladas fueron expuesta a un incremento de alto lactato. Con esta misma técnica, parche perforado, pero registrando con la configuración de *voltage-clamp* se utilizó un protocolo de rampa (desde -70 mV hasta 10 mV) que nos permitió registrar la variación de la corriente a diferentes potenciales, permitiendo analizar tanto los canales de fuga como los canales voltaje-dependientes. Además, con este protocolo se determinaron parámetros electrofisiológicos como la resistencia de entrada de la celular, que

se calculó a partir de la pendiente de la rampa registrada entre valores de -60 a -40mV; el umbral de reversión, que es el voltaje al cual la corriente pasa de ser negativa a positiva y que viene determinada por la sensibilidad de los canales voltaje-dependiente de potasio; el *holding current* o corriente de entrada, que es la cantidad de corriente negativa que debe suministrarse a la célula para llevar el potencial de membrana de reposo al potencial de membrana fijado (-70 mV); y la amplitud de la corriente a + 10mV, que es la amplitud de la corriente de salida que se registra cuando la célula está a un voltaje fijo de 10 mV.

Con la configuración de *whole-cell* en la modalidad de *voltage-clamp* se registró la capacitancia de las células, parámetro que nos da una idea del tamaño de las células. Además, se aplicaron pulsos despolarizantes a distintos voltajes para obtener curvas corriente/voltaje (I/V).

5.2. Técnicas microfluorimétricas

Estas técnicas permiten detectar cambios en las concentraciones intracelulares de distintas sustancias haciendo uso de marcadores fluorescentes específicos que, tras ser excitados con la longitud de onda específica, modifican la fluorescencia emitida al variar la concentración de la sustancia en cuestión. Gracias a la microfluorimetría hemos medido cambios en los niveles intracelulares de Ca^{2+} , pH y NADH en células dispersas. Además, hemos podido registrar los niveles de ROS en el espacio intermembrana mitocondrial y el citosol en rodajas de CC. A continuación, se detallan el equipamiento utilizado para medir fluorescencia tanto en células glómicas dispersas como en rodajas de CC; y los protocolos experimentales utilizados para medir cada variable. La composición de las soluciones de registro utilizada se muestra en el apartado 6 “Soluciones de registro. Tabla 2”.

5.2.1. Equipamiento de registro microfluorimétrico

El *set-up* de registro utilizado fue diferente para el registro de células glómicas aisladas y para el registro de rodajas de CC.

- **Equipamiento de registro microfluorimétrico en células glómicas dispersas**

El *set-up* para realizar los experimentos de microfluorimetría en célula dispersas de CC consta de un microscopio invertido (*Axiinvert 35, Zeiss*) equipado con objetivos de 40x/0,60 NA (PlanFluoR), un monocromador (*Polychrome V, Till Photonics*) con una lámpara de xenón de 150 W como fuente de excitación. Para la detección de la luz emitida

por la muestra el sistema lleva incorporada una cámara CCD (Orca Flash 4, *Hamamatsu Photonics*, Japón). El monocromador, la cámara CCD y la imagen adquirida son controlados por el programa Aquacosmos (*Hamamatsu Photonics*). El monocromador es un dispositivo óptico que permite seleccionar la longitud de onda (λ). El haz de luz, proporcionado por el monocromador, viaja a través de una fibra óptica hasta el microscopio, incide en un espejo dicroico con una inclinación de 45° (FF409-Di03 *Semrock*) que refleja hacia la muestra las λ por debajo de 409 y por encima las deja pasar. El haz llega a la muestra cargada con el indicador, este se excita y emite fluorescencia a una λ mayor a la del corte del dicroico, atravesándolo sin ser reflejada. A continuación, la radiación atraviesa el filtro de emisión (FF01-510/84 *Semrock*) y es dirigida a la cámara CCD. Finalmente, la información recogida por la cámara es monitorizada en el ordenador (Figura 21).

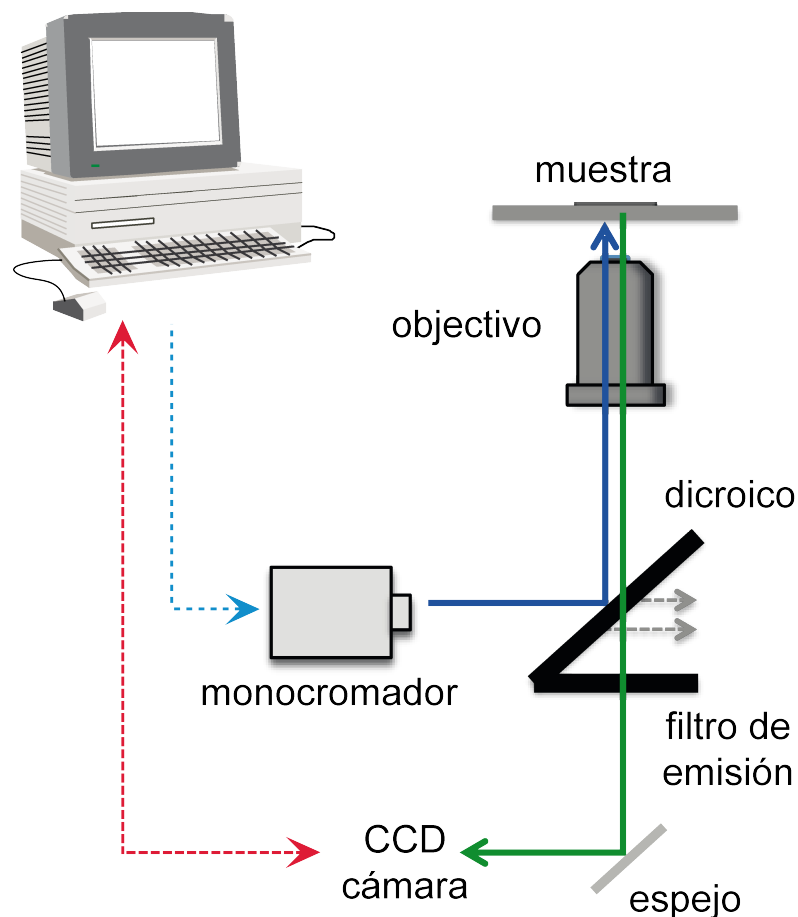


Figura 21. Equipamiento de microfluorimetría. Esquema representativo del equipamiento de microfluorimetría para registrar células glómicas aisladas. En azul se muestra el recorrido de la λ de excitación emitida por el monocromador. Esta llega a la muestra al ser reflejada por el espejo dicroico excitando al fluoróforo y produciendo la emisión de fluorescencia, en verde, que a su vez atraviesa el dicroico y el filtro de emisión para ser recogida por la cámara CCD y la información es monitorizada en el ordenador. Figura modificada de Muñoz-Cabello *et al.*, (2018).

- **Equipamiento de registro microfluorimétrico en rodajas de cuerpo carotídeo**

El *set-up* para realizar los experimentos de microfluorimetría en rodajas de CC consta de un microscopio directo (*Olympus Bx51*) equipado con un objetivo 60x/0,90 NA (*Olympus LUMPlanFI/IR*), un monocromador (*Polychrome V, Till Photonics*) con una lámpara de xenón de 150 W como fuente de excitación. Para la detección de la luz emitida por la muestra el sistema lleva incorporada una cámara CCD iXon3 (*Andor technology*). El monocromador, la cámara CCD y la imagen adquirida son controlados por el programa *Live Acquisition* (*Till Photonics*). El monocromador es un dispositivo óptico que permite seleccionar la longitud de onda (λ). El haz de luz, proporcionado por el monocromador, viaja a través de una fibra óptica hasta el microscopio, incide en un espejo dicróico con una inclinación de 45° (*DiO2-R488 Semrock*) que refleja hacia la muestra las λ por debajo de 488nm y por encima las deja pasar. El haz llega a la muestra cargada con el indicador, este se excita y emite fluorescencia a una λ mayor a la del corte del dicróico, atravesándolo sin ser reflejada. A continuación, la radiación atraviesa el filtro de emisión (*FF01-520/35 Semrock*) y es dirigida a la cámara CCD. Finalmente, la información recogida por la cámara es monitorizada en el ordenador (El esquema del equipamiento es igual que el de la Figura 21 pero el microscopio es directo, no invertido).

5.2.2. Medida de cambios en la concentración citosólica de distintas especies

- **Cambios en la concentración de calcio citosólico**

Los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} se monitorizaron con el indicador ratiométrico Fura-2 acetoxymethyl ester (AM) (*TefLabs MW 1002*) (*Ureña et al.*, 1994; *Muñoz-Cabello et al.*, 2018; *Ortega-Sáenz et al.*, 2018) en células dispersas del CC. Este indicador atraviesa la membrana celular y cuando las esterasas intracelulares cortan el grupo -AM el fluoróforo queda atrapado en el citoplasma. Cuando se excita el Fura-2 con una longitud de onda de 340 nm, la intensidad de emisión a 510 nm aumenta de forma directamente proporcional al incremento de la concentración citosólica de Ca^{2+} . Sin embargo, si la excitación se realiza a una longitud de onda de 380 nm, los cambios en la emisión son inversamente proporcionales al incremento citosólico de dicho ión. Los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular se expresaron como cambios relativos a partir del ratio de emisión a 340/380. Para realizar los experimentos las células dispersas sembradas en cubres

de poli-L-lisina se cargaron durante 30 min en medio de cultivo sin FBS con 2 μ M de Fura-2AM en el incubador, a 37°C y 5% de CO₂. Antes del registro se lavaron durante 10 min en medio de cultivo con FBS y sin Fura-2AM.

- **Cambios en la concentración citosólica de NADH**

El NADH es una molécula autofluorescente. Para medir los cambios en la concentración de NADH producidos por la hipoxia o lactato en células dispersas del CC se empleó un protocolo no ratiométrico en el que se excitaron las células glómicas dispersas con luz ultravioleta (360 nm) y se detectó la fluorescencia emitida a 460 nm (Duchen y Biscoe, 1992; Buckler y Turner, 2013; Muñoz-Cabello *et al.*, 2018). Los cambios en la concentración de NADH citosólico se expresaron como cambios relativos a partir del valor de autofluorescencia detectada en normoxia al inicio del experimento.

- **Cambios de pH citosólico**

Los cambios en el pH intracelular se monitorizaron en células dispersas del CC con el indicador ratiométrico 2',7'-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein Acetoxymethyl Ester, abreviado como BCECF-AM (*ThermoFisher, scientific*) (Muñoz-Cabello *et al.*, 2015). Este indicador atraviesa la membrana celular y queda atrapado en el citoplasma donde las esterasas celulares cortan el grupo -AM. Cuando se excita el BCECF con una longitud de onda de 490 nm, la intensidad de emisión a 535 nm aumenta de forma directamente proporcional al incremento pH intracelular. Sin embargo, si la excitación se realiza a una longitud de onda de 440 nm, los cambios en la emisión son inversamente proporcionales al incremento del pH intracelular. Los cambios de pH intracelular se expresaron como cambios relativos a partir del ratio de emisión a 490/440. Las células dispersas se cargaron durante 15-30 min en PBS con 2 μ M de BCECF-AM a temperatura ambiente y en oscuridad antes de ser registradas.

- **Medida de la producción de especies reactivas de oxígeno**

Usamos la sonda *reduction-oxidation sensitive green fluorescent protein* (roGFP) para la detección microfluorimétrica de ROS. RoGFP es una proteína fluorescente que permite la visualización, en tiempo real, del estado de oxidación de la célula (Dooley *et al.*, 2004). Una de las ventajas de esta sonda es que detecta en pocos segundos cambios de ROS de forma

reversible. RoGFP es una proteína GFP modificada genéticamente, tiene dos cisteínas en posición 147 y 204 cercanas al grupo cromóforo que forman un puente disulfuro susceptible de ser oxidado o reducido variando así la conformación de la proteína. Este cambio conformacional produce un cambio de intensidad de emisión cuando la sonda fluorescente es excitada previamente con la longitud de onda adecuada. El indicador roGFP se excitó a 400 y 480 nm y la fluorescencia emitida se detectó a 525 nm.

Para la transducción se utilizaron vectores adenovirales con la construcción para roGFP (*ViraQuest Inc*), dirigidas al citosol (VQAd ro-GFP stock 1×10^{12} pts/ml) y espacio intermembrana (VQAd CMV GDFro-GFP stock 1×10^{12} pts/ml). Para simplificar en este trabajo nos referiremos como cito-roGFP e EIM-roGFP, respectivamente. Los experimentos se llevaron a cabo en rodajas de CC. Los cultivos se infectaron y se registraron a las 48 horas de la transducción. Los niveles máximos de oxidación y reducción se determinaron añadiendo H_2O_2 0,1 mM y ditioneitol (DTT) 1 mM, respectivamente y midiendo su emisión con la sonda cito-roGFP. Los cambios en la producción de ROS del espacio intermembrana mitocondrial se expresaron como cambios relativos a partir del ratio de emisión a 400/480.

6. Soluciones de registro

Para llevar a cabo los distintos registros *in vitro*, tanto las rodajas de CC como las células glómicas dispersas fueron perfundidas con distintas soluciones externas, todas con una osmolaridad de 300 mOsm/Kg y un pH de 7,4: que fue ajustado burbujando con 5% CO_2 en el caso de las soluciones externa que tenía el bicarbonato sódico como tampón o con sales (NaOH o HCl) en el caso de la solución externa con tampón HEPES. Para hacer los experimentos de dosis dependencia de O_2 se utilizaron botellas con distintos porcentajes de O_2 : Normoxia 145 mmHg de O_2 ; 12% O_2 , 85 mmHg de O_2 ; 6% O_2 , 45 mmHg de O_2 ; 3% O_2 , 25 mmHg de O_2 e hipoxia, (0% de O_2) 45 mmHg de O_2 (tabla 2).

Para el registro intracelular con la técnica de *patch-clamp* se utilizaron distintas soluciones intracelulares y extracelulares en función de la configuración utilizada (*Whole-cell* o parche perforado) así como del tipo de macrocorrientes que se quisiera registrar (Tablas 3). En cada experimento, el pH de la solución interna se ajustó a 7,2 y la osmolalidad fue aproximadamente de 285 mOsm/kg. Para los experimentos con 10 o 20 mM de succinato potásico en la solución intracelular de registro con parche perforado se intercambiaron estequiométricamente dichas concentraciones con las de sulfato potásico.

La comprobación del estado fisiológico de las células glómicas, en las técnicas de amperometría y medición microfluorimétrica de calcio intracelular, se realizó

Materiales y Métodos

despolarizándolas con la solución de alto potasio. Las distintas concentraciones de lactato se obtuvieron cambiando estequiométricamente el cloruro sódico por L-lactato sódico. Los experimentos realizados para conocer el efecto de 2,5 de α -KB, 10 mM de piruvato sódico, 5 mM de dimetil-succinato y 5 mM de dimetil-malonato en la respuesta a hipoxia o en los parámetros fisiológicos de las células glómicas, se llevaron a cabo añadiendo los distintos compuestos a la solución de registro. En los casos donde las concentraciones añadidas fueron mayores que 5 mM se hicieron sustituyendo estequiométricamente su concentración por las de NaCl. Para los experimentos crónicos de α -KB y piruvato, las células fueron incubadas durante la noche con 2,5 mM de α -KB o 10 mM de piruvato sódico a 37°C en el incubador de 5% de CO₂. Los experimentos al día siguiente se realizaron añadiendo 2,5 mM de α -KB o 10 mM de piruvato sódico a la solución externa control de registro (Normoxia, Tabla 2).

	Normoxia	Hipoxia	3%O ₂	6%O ₂	12%O ₂	lactato	Hipercapnia	potasio
NaCl	117	117	117	117	117	87	117	81,5
KCl	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	40
NaHCO ₃	23	23	23	23	23	23	23	23
MgCl ₂	1	1	1	1	1	1	1	1
CaCl ₂	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Glucosa	5	5	5	5	5	5	5	5
Sacarosa	5	5	5	5	5	5	5	5
L-Lactato	0	0	0	0	0	20	0	0
%CO ₂	5	5	5	5	5	5	20	5
%N ₂	75	95	90	88	84	75	60	75
20% O ₂	20	0	3	6	12	20	20	20

Tabla 2. Soluciones y mezclas de gases de registro. Las soluciones están expresadas en mM y los gases en %. Lactato: hace referencia a lactato sódico

Solución interna			
<i>Whole-cell</i>			Parche perforado
	I _{Na} , I _{Ca}	I _K	I _K
CsCl	110	-	K ₂ SO ₄ 70
Gluconato potásico	-	80	KCl 30
KCl	-	50	HEPES 10
CsF	30	-	EGTA 1
HEPES	10	10	MgCl ₂ 2
EGTA	10	5	Anfotericina B (µg/ml) 240
MgCl ₂	-	1	
ATP-Mg	4	4	

Tabla 3A. Composición de la solución interna para registro de *patch-clamp* en células glómicas dispersas de cuerpo carotídeo. Las concentraciones están expresadas en mM salvo la Anfotericina B (µg/ml).

Solución externa		
	I_{Na}, I_{Ca}	I_K
NaCl	140	120
BaCl₂	10	-
CaCl₂	2,5	2,5
KCl	2,5	4,5
NaHCO₃	-	23
HEPES	10	-
MgCl₂	1	1
Glucosa	5	5
Sacarosa	5	5

Tabla 3B. Composición de la solución externa para registro de *patch-clamp* en células glómicas dispersas de cuerpo carotídeo. Las concentraciones están expresadas en mM.

7. Análisis estadístico de los datos

Los datos se presentan como la media \pm error estándar de la media. La comparación de dos grupos independientes se realizó mediante el test *t de Student*. Para comparar más de dos grupos independientes se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) y a continuación los *tests post hoc de Tukey* o de *Student-Newman-Keuls*. Los datos que no se ajustaron a una distribución normal se analizaron con el test no paramétrico *U-Mann Witney*. Las diferencias entre los grupos estudiados se consideraron estadísticamente significativas cuando el valor de *p* fue menor de 0,05.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. Inhibición de la respuesta aguda a hipoxia en quimiorreceptores arteriales periféricos tras la ablación inducible del gen *Ndufs2* en ratones adultos

1.1. Ratones ESR-NDUFS2. Tratamiento y evolución de la línea

Los ratones ESR-NDUFS2 aparecieron en las camadas en proporción mendeliana y no presentaron ningún rasgo que permitiese distinguirlos de los controles en la etapa postnatal ni durante el tratamiento con TMX. En este trabajo se compararon animales ESR-NDUFS2 (flox/-; Cre/+ o Cre/Cre) con animales controles (+/+ o flox/+; sin Cre) de la misma camada. En el estudio histológico del CC se observó que tanto el volumen del CC como el número de células TH+ eran similares entre los animales controles y los animales con déficit inducido de *Ndufs2*. Sin embargo, tras finalizar el tratamiento con TMX, los animales ESR-NDUFS2 comenzaron a deteriorarse en comparación con los controles, mostrando una disminución de peso y una notable cifosis; produciéndose la muerte de los mutantes a partir de la cuarta semana tras finalizar la exposición a TMX (Fernández-Agüera *et al.*, 2015). Por este motivo, los estudios experimentales en los ratones de la línea ESR-NDUFS2 se realizaron con animales de unos 4 meses de edad (ver Figura 14 de “Métodos”). Aunque esto no se estudió con detalle, la muerte de los ratones ESR-NDUFS2 posiblemente se debió a un fracaso de órganos vitales por la falta generalizada de función del CMI.

1.2. Pérdida gradual de las respuestas a hipoxia, sistémica y celular, en paralelo con la disminución de la función del complejo mitocondrial I en ratones ESR-NDUFS2

Los resultados previos de nuestro laboratorio en ratones TH-NDUFS2 mostraban que la delección embrionaria del gen *Ndufs2* abole selectivamente la respuesta a hipoxia de las células glómicas del CC. Para comprobar si la pérdida de la sensibilidad a hipoxia es dependiente de la actividad de CMI y descartar la posibilidad de que fuese debida a una adaptación producida durante el desarrollo embrionario ante dicha delección, se diseñó un modelo de ratón donde se induce la ablación del gen *Ndufs2* en la etapa adulta del animal mediante la administración de una dieta con TMX (Fernández-Agüera *et al.*, 2015), (ver “Introducción” y “Métodos”). Este modelo nos permitió estudiar en paralelo el lavado de la proteína NDUFS2 y la pérdida gradual de respuesta a hipoxia aguda tanto a nivel sistémico, en el animal completo, como a nivel celular, en las células glómicas del CC.

1.2.1. Análisis de la función del complejo mitocondrial I

El gen *Ndufs2* codifica la subunidad NDUFS2 de 49KDa, localizada en el bolsillo catalítico del CMI, donde se ceden los electrones a la ubiquinona para convertirla en ubiquinol (ver “Introducción”). Se ha descrito previamente que en el modelo ESR-NDUFS2, no se ensambla el CMI debido a la mutación de esta subunidad y como consecuencia, tampoco se registra la actividad del CMI medida en mitocondrias aisladas de riñón y corazón (Fernández-Agüera *et al.*, 2015).

Se realizaron experimentos para comprobar cómo afectaba la ablación inducida del gen *Ndufs2* a la actividad del CMI durante el tratamiento con TMX. Para ello, la medida de actividad del CMI se realizó justo antes de iniciar el tratamiento con TMX, que desde ahora llamaremos punto pre-TMX, 7-10 días tras terminar el tratamiento, que denominaremos post-TMX y finalmente entre 21-28 días post-TMX, que en adelante llamaremos punto final (ver Figura 22 A). Los resultados obtenidos mostraron que la actividad de CMI disminuyó tras el tratamiento con TMX en los animales ESR-NDUFS2 (puntos verdes, Figura 22 B).

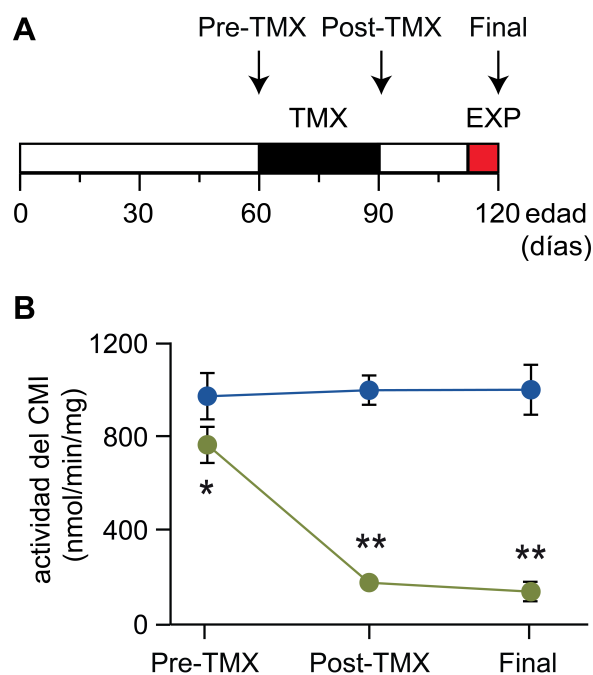


Figura 22. Pérdida de la actividad del CMI tras el tratamiento con TMX en ratones ESR-NDUFS2. (A) Diseño experimental. Los animales de dos meses de edad fueron tratados durante 30 días con dieta con tamoxifeno (TMX; negro); posteriormente los experimentos fueron realizados entre la tercera y la cuarta semana tras terminar el tratamiento (EXP; azul). Las flechas indican los puntos donde se realizaron las medidas del curso temporal. (B) Medida de la actividad del CMI (en nmol/min/mg) en extractos mitocondriales de riñón de ratones control (azul) y ESR-NDUFS2 (verde) en los diferentes puntos del curso temporal (control: pre-TMX, 977 ± 99, post-TMX 1003 ± 62 y final, 1005 ± 106 y ESR-NDUFS2: pre-TMX, 770 ± 77, post-TMX 182 ± 19 y final 144 ± 25. n=5/grupo). Los datos representan la media ± SEM. *p < 0,05, **p < 0,001 de los valores en cada punto comparado con los valores en situación control.

1.2.2. Respuesta ventilatoria a hipoxia aguda

Una vez caracterizado el curso temporal de la pérdida de actividad del CMI se estudió si ésta se producía en paralelo a la inhibición selectiva de la respuesta ventilatoria a hipoxia aguda en los animales con delección de *Ndufs2* en la vida adulta. Para ello, parejas de ratones controles y ESR-NDUFS2 de la misma camada se sometieron a pletismografía (ver “Métodos”) y se analizó la frecuencia respiratoria en condiciones de normoxia y las variaciones de dicha frecuencia ante hipoxia (10% O₂ durante 5 minutos) e hipercapnia (4-5% CO₂ durante 1 minuto) en los cuatro puntos del curso temporal estudiados (pre-TMX, 4-7 días post-TMX, 10-14 días post-TMX y final). Los ratones controles mostraron un incremento reversible y significativo de frecuencia respiratoria en respuesta a hipoxia e hipercapnia, en los cuatro puntos estudiados (Figura 23 A-D, puntos azules). Sin embargo, en ratones ESR-NDUFS2 la RVH se fue aboliendo gradualmente tras finalizar el tratamiento con TMX llegando a perderse completamente en el punto final (Figura 23, A-D, puntos verdes). No obstante, en este punto final, los ratones ESR-NDUFS2 fueron capaces de hiperventilar reversiblemente durante su exposición a hipercapnia como se puede ver en los registros representativos de la Figura 23 (paneles E-F) y como demuestra la cuantificación de la frecuencia respiratoria ante los estímulos de hipoxia e hipercapnia en animales controles y ESR-NDUFS2 (Figura 23 G). Estos datos sugieren que la pérdida sistémica gradual de la respuesta a hipoxia de los ratones ESR-NDUFS2 es dependiente del lavado de la proteína NDUFS2 tras el tratamiento con TMX.

1.2.3. Propiedades funcionales de las células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2

Con objeto de mostrar si la supresión de la RVH en los ratones ESR-NDUFS2 se debe al lavado inespecífico de la proteína NDUFS2 en diferentes tejidos o a alteraciones funcionales de las células glómicas debido a la delección de este gen, se analizaron las propiedades electrofisiológicas de dichas células, así como la capacidad de estas células de responder a hipoxia, estudiando distintas etapas de la ruta de quimiotransducción de la activación en hipoxia en los ratones ESR-NDUFS2 (ver “Introducción”).

1.2.3.1. Respuesta secretora a hipoxia en rodajas de cuerpo carotideo

La respuesta neurosecretora a hipoxia en rodaja de CC fue registrada con la técnica de amperometría, con la que se monitoriza la secreción cuántica de dopamina por exocitosis (ver

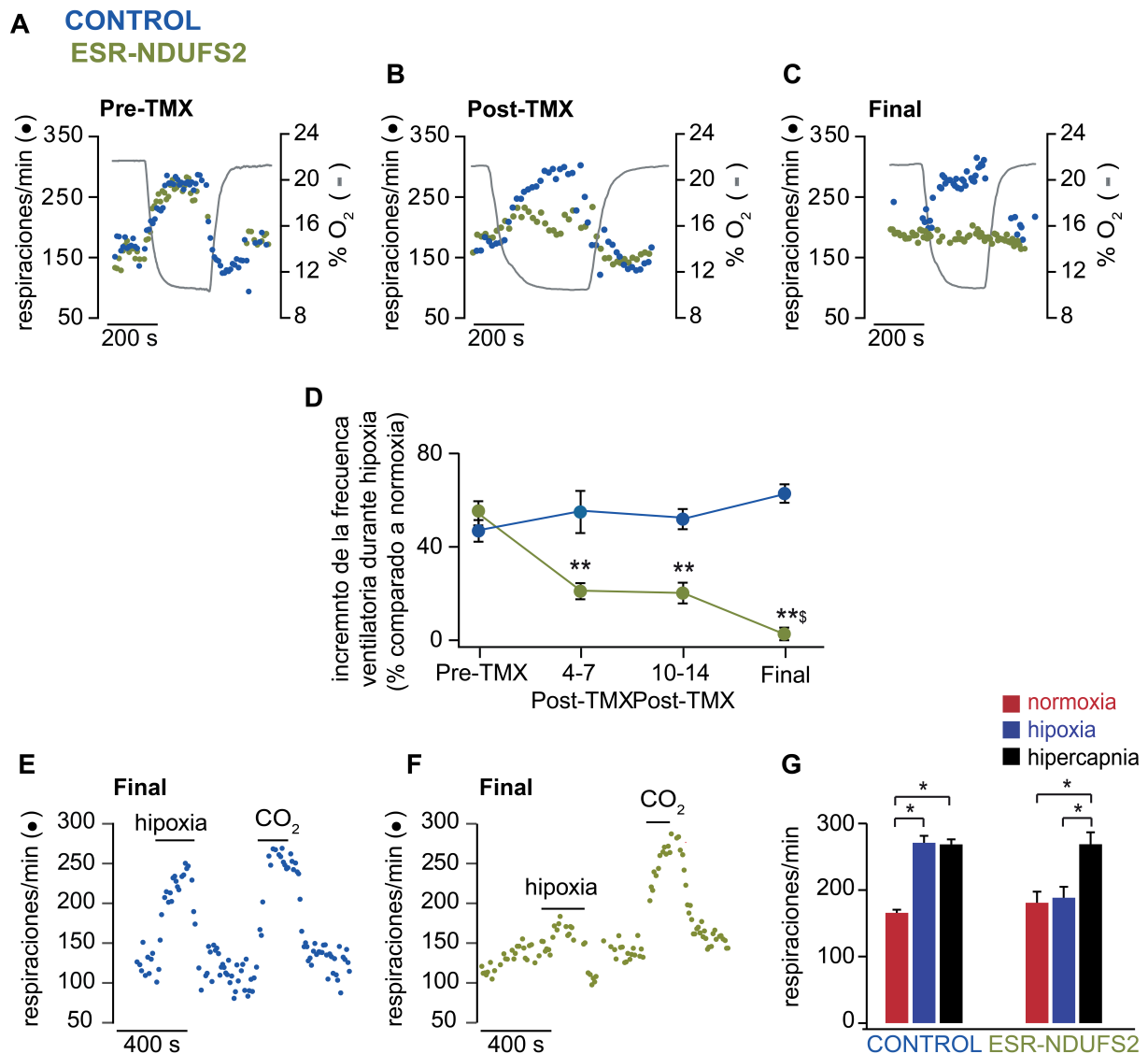


Figura 23. Curso temporal de la pérdida de la respuesta ventilatoria a hipoxia en ratones ESR-NDUFS2. (A-C) Registros pletimográficos representativos del cambio en la frecuencia respiratoria durante hipoxia en ratones controles (azul) y en ESR-NDUFS2 (verde) en los puntos pre-TMX, 4-7 días post-TMX y final. (D) Medida del porcentaje del incremento de la respuesta respiratoria a hipoxia en ratones controles y ratones ESR-NDUFS2 (Controles: 9 ratones en pre-TMX; 7 ratones en 4-7 días post-TMX; 5 ratones en 10-14 días post-TMX y 6 ratones en punto final. Ratones ESR-NDUFS2: 10 ratones en pre-TMX; 9 ratones en 4-7 días post-TMX; 6 ratones en 10-14 días post-TMX y 7 ratones en punto final). (E-F) Registros pletimográficos representativos de los cambios de la frecuencia respiratoria en respuesta a hipoxia e hipercapnia en animales controles (E) y ESR-NDUFS2 (F) en punto final. Nótese que la frecuencia respiratoria no varía entre los periodos de normoxia e hipoxia en el animal ESR-NDUFS2. (G) Cuantificación de la frecuencia respiratoria de ratones controles y ESR-NDUFS2 en normoxia, hipoxia e hipercapnia (Control: normoxia $165,72 \pm 4,70$ resp/min; hipoxia $270,98 \pm 10,41$ resp/min; e hipercapnia $268,55 \pm 7,59$ resp/min en 6 ratones y ESR-NDUFS2: normoxia $180,90 \pm 16,57$ resp/min; hipoxia $188,36 \pm 16,44$ resp/min; e hipercapnia $268,77 \pm 17,94$ resp/min en 10 ratones). Los datos representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$ comparado con control; \$ $p < 0,05$ comparado con 4-7 días post-TMX.

Resultados

“Métodos”). Los registros representativos que se ilustran en la Figura 24 A mostraron que en “punto final”, las rodajas de CC de ratones controles manifestaban una potente respuesta secretora en exposiciones tanto a hipoxia aguda, como a hipercapnia o a la despolarización con alto potasio (panel izquierdo). Sin embargo, en las rodajas de CC de los ratones ESR-NDUFS2 se encontraba abolida selectivamente la respuesta a hipoxia, aunque fueron capaces de responder a otros estímulos como alto potasio o hipercapnia (Figura 24 A, derecha). Además, la tasa de secreción en respuesta a hipoxia se cuantificó en los tres puntos temporales del tratamiento con TMX como se ilustra en la Figura 24 B.

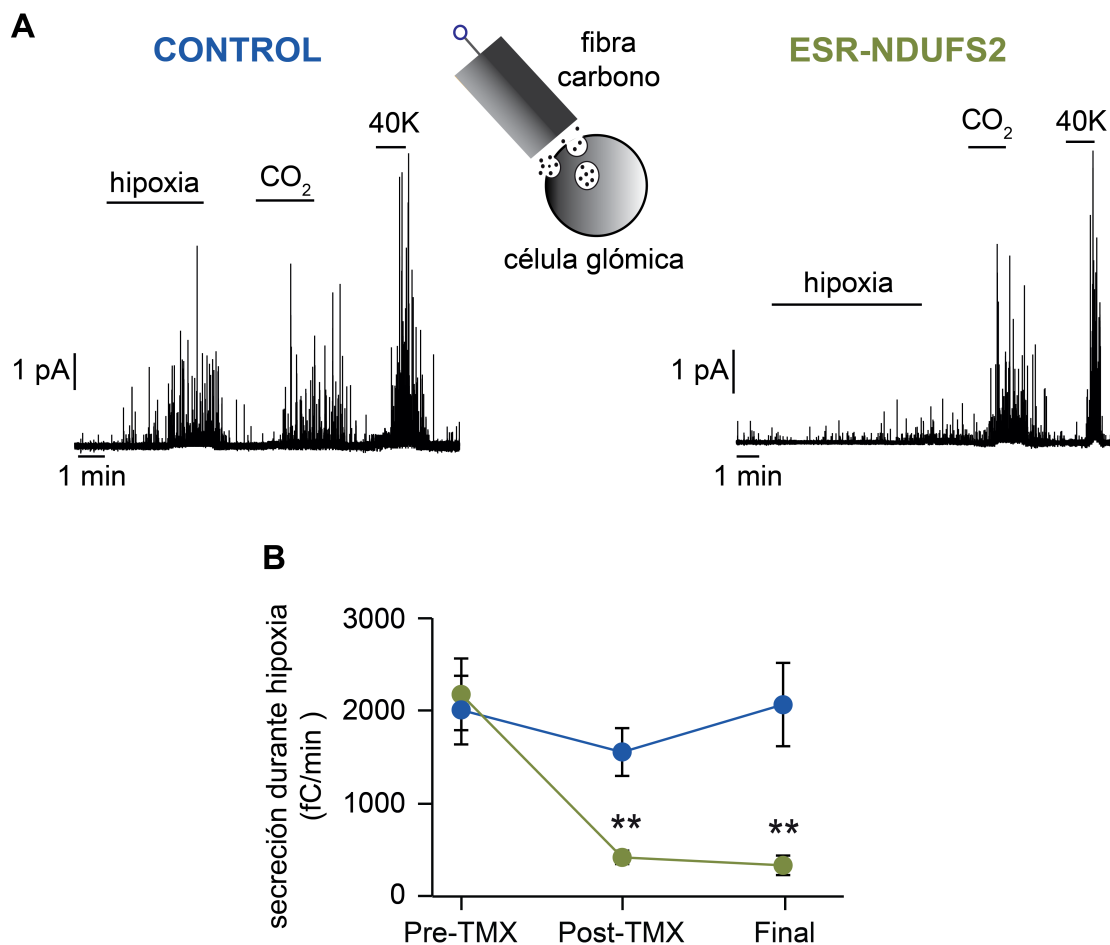


Figura 24. Respuesta secretora a hipoxia, hipercapnia y alto potasio de células glómicas en rodajas de cuerpo carotídeo de ratones controles y ESR-NDUFS2. (A) Registros amperométricos representativos de la respuesta secretora frente a diferentes estímulos obtenidos de células glómicas en rodajas de CC de ratones controles (azul) y ESR-NDUFS2 (verde). Entre ambos registros se muestra un dibujo esquemático de la liberación de dopamina en una célula glómica registrada con la técnica de amperometría. (B) Cuantificación de la tasa de secreción inducida por hipoxia en rodajas de CC de ratones controles (azul) y en ratones ESR-NDUFS2 (verde) en los diferentes puntos del curso temporal (Control: pre-TMX, 2012 ± 372 fC/min en 11/5 registros/cultivos; post-TMX 1556 ± 259 fC/min en 10/4 registros/cultivos y final 2071 ± 452 fC/min en 11/7 registros/cultivo. ESR-NDUFS2: pre-TMX, 2183 ± 388 fC/min en 8/4 registros/cultivos, post-TMX 375 ± 75 fC/min en 16/5 registros/cultivos y final 326 ± 106 fC/min en 7/4 registros/cultivo). Los datos representan la media ± SEM. ** p < 0,001 comparado con control.

Los resultados demuestran que la pérdida de la respuesta secretora ante hipoxia es selectiva y gradual en ratones ESR-NDUFS2 tras el TMX y con un curso temporal similar a la pérdida de actividad del CMI (Figura 22 B) y a la pérdida de la respuesta ventilatoria (Figura 23 D).

1.2.3.2. Cambios en la concentración de calcio intracelular

Como se describió en la “Introducción”, en el modelo de membrana de quimiotransducción aceptado actualmente, la secreción de neurotransmisores por las células glómicas en respuesta a hipoxia se debe al incremento de calcio intracelular. Por este motivo, tras mostrar la pérdida progresiva de la respuesta secretora a hipoxia en ratones ESR-NDUFS2 se estudiaron los cambios en la concentración de calcio intracelular en respuesta a diferentes estímulos en células glómicas aisladas de CC cargadas con Fura2-AM (ver “Métodos”). Los resultados cuantificados mostraron que la elevación de calcio intracelular inducida por hipoxia, características de las células glómicas controles (Figura 25 A), estaba abolida en las células de los ratones ESR-NDUFS2 registrados a “punto final” (Figura 25 B). No obstante, las células glómicas de los ratones con déficit inducido de gen *Ndufs2* fueron capaces de responder a otros estímulos como hipercapnia, hipoglucemia o alto potasio (Figura 25).

1.2.3.3. Caracterización electrofisiológica de las células glómicas del modelo de ratón ESR-NDUFS2

Los resultados obtenidos con las técnicas amperométricas y microfluorimétricas mostraron la desaparición selectiva de la respuesta a hipoxia en las células glómicas deficientes para el gen *Ndufs2*, tanto en el modelo embrionario (TH-NDUFS2, ver Fernández-Agüera *et al.*, 2015) como en el modelo adulto (ESR-NDUFS2, ver Figuras 24 y 25). Sin embargo, las propiedades electrofisiológicas del modelo TH-NDUFS2 estaban alteradas y mostraban diferencias significativas en algunos parámetros como la resistencia de entrada o el potencial de membrana cuestionando si estas alteraciones podrían ser responsables de la pérdida selectiva de la respuesta a hipoxia en el modelo embrionario. Por este motivo, se procedió al estudio de los parámetros electrofisiológicos de las células glómicas de CC de ratones controles y ESR-NDUFS2 a “punto final” y en condiciones de normoxia.

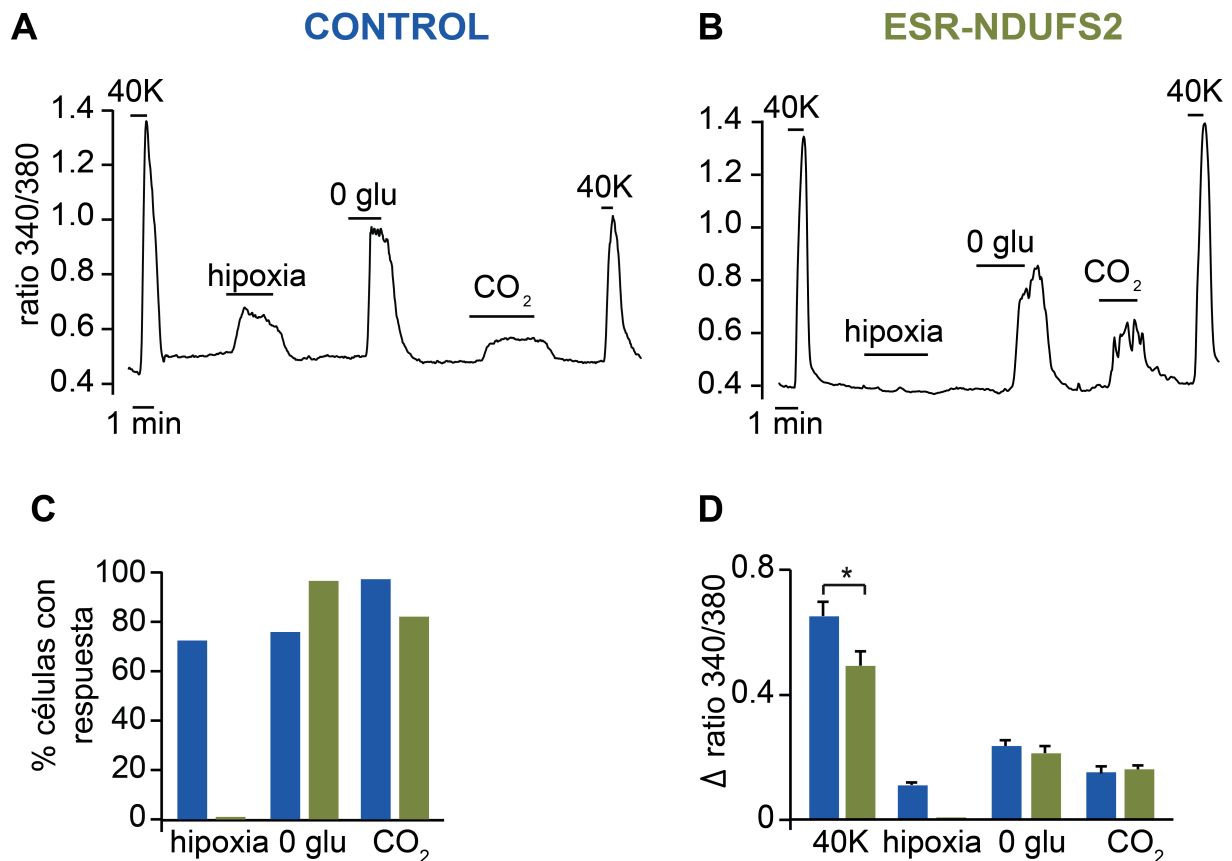


Figura 25. Pérdida del incremento de calcio intracelular en células glómicas de ratones ESR-NDUFS2. (A-B) Registros representativos de los cambios en la $[Ca^{2+}]_{in}$ en células controles (A, azul) y ESR-NDUFS2 (B, verde). (C) Porcentaje de células que respondieron con un incremento en la $[Ca^{2+}]_{in}$ a los diferentes estímulos, normalizadas al número total de células que respondieron a alto K^+ , en ratones controles (barras azules) y ESR-NDUFS2 (barras verdes). Controles: 62/9 células/ratones a hipoxia, 44/7 células/ratones a hipoglucemia y 52/9 células/ratones a hipercapnia; y ESR-NDUFS2: 56/3 células/ratones a hipoxia, 39/3 células/ratones a hipoglucemia y 43/3 células/ratones a hipercapnia. (D) Cuantificación del incremento de calcio, expresado como incremento del ratio 340/380, en células controles (azul) y ESR-NDUFS2 (verde) en respuesta a alto K^+ , hipoxia, hipoglucemia o hipercapnia. (controles: K^+ : $0,65 \pm 0,05$ u.a. en 62/9 células/ratones; hipoxia: $0,11 \pm 0,09$ u.a. en 62/9 células/ratones; hipoglucemia: $0,23 \pm 0,02$ u.a. en 39/7 células/ratones e hipercapnia: $0,15 \pm 0,012$ u.a. en 49/9 células/ratones y ESR-NDUFS2: K^+ : $0,49 \pm 0,04$ u.a. en 56/3 células/ratones; hipoxia: 0 u.a. en 56/3 células/ratones; hipoglucemia: $0,21 \pm 0,021$ u.a. en 33/3 células/ratones e hipercapnia: $0,16 \pm 0,012$ u.a. en 34/3 células/ratones). Los datos representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$ comparado con control. u.a. unidades arbitrarias.

- **Parámetros electrofisiológicos de las células glómicas con déficit inducido de *Ndufs2***

En la tabla 4 se muestran las propiedades electrofisiológicas de las células glómicas en ratones controles y ESR-NDUFS2 medidas con la técnica de *patch-clamp* en las configuraciones de parche perforado y *whole-cell*.

	Whole-cell		Parche perforado	
	CONTROL	ESR-NDUFS2	CONTROL	ESR-NDUFS2
Capacitancia celular (pF)	2.06 ± 0.08 (32)	1.82 ± 0.06* (33)	-	-
Resistencia de entrada (GOhm)	-	-	3.22 ± 0.24 (18)	3.15 ± 0.20 (18)
Potencial de membrana (mV)	-	-	-43.67 ± 1.33 (15)	-43.87 ± 0.17 (23)
Potencial de reversión (mV)	-	-	-30 ± 1.24 (24)	-31 ± 1.47 (26)

Tabla 4. Propiedades electrofisiológicas de las células glómicas controles y ESR-NDUFS2. Los datos representan la media ± SEM.; el número de células registradas se indica entre paréntesis. *p<0,05

Para estudiar la capacidad de las células glómicas de los ratones control y ESR-NDUFS2 se registraron las corrientes capacitativas utilizando la técnica de *patch clamp* en la configuración de *whole-cell* (ver “Métodos”). Como se muestra en la Tabla 4, las células glómicas de ratones ESR-NDUFS2 tienen una capacitancia significativamente menor que los controles, indicando un menor tamaño celular. También se estudiaron otros parámetros electrofisiológicos de la membrana plasmática con la configuración de parche perforado usando el protocolo de rampa en *voltage-clamp* (Figura 26, arriba); (Ver “Métodos”) y medimos la resistencia de entrada y el potencial de reversión. Además, se utilizó la modalidad de *current-clamp* para analizar el potencial de membrana en reposo. El análisis de los registros mostró que no había diferencia significativa en la resistencia de entrada, el potencial de membrana y el potencial de reversión entre las células con un déficit inducido de *Ndufs2* y las células aisladas de los ratones controles (Tabla 4 y Figura 26).

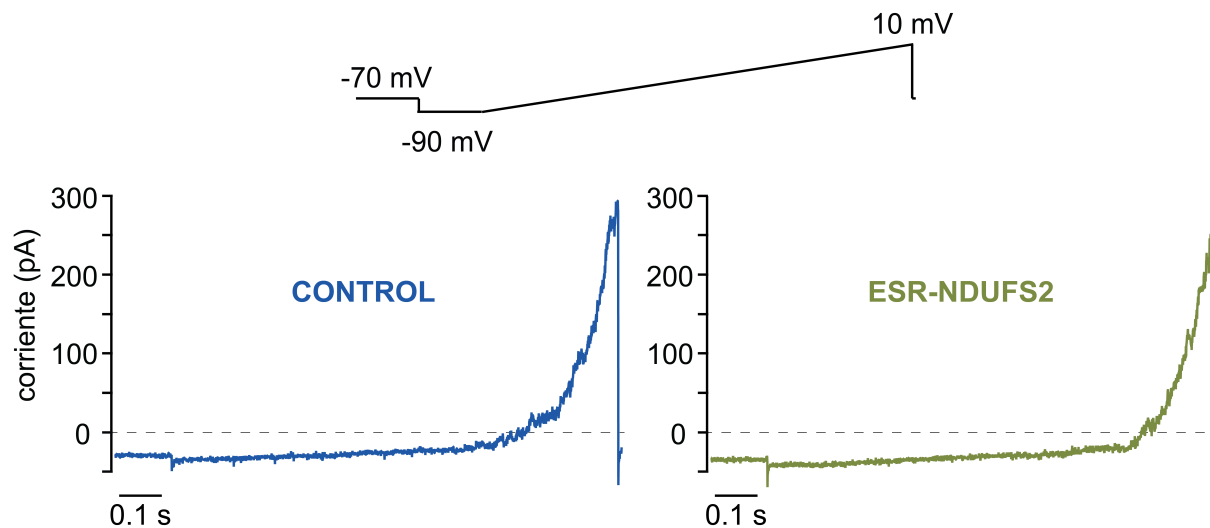


Figura 26. Propiedades electrofisiológicas de las células glómicas controles y ESR-NDUFS2. (arriba) Protocolo de rampa de voltaje aplicado a las células glómicas para registrar las corrientes con la técnica de parche perforado. (abajo) Corrientes registradas en normoxia en células glómicas controles (azul, izquierda) y ESR-NDUFS2 (verde, derecha).

Los resultados obtenidos fueron comparados con los publicados en el modelo de ratón embrionario TH-NDUFS2 donde había un incremento de la resistencia de entrada en las

células glómicas aisladas y como consecuencia, el potencial de membrana de estas células estaba más despolarizado que el de las células glómicas controles (Fernández-Agüera *et al.*, 2015). Tras comparar ambos modelos animales con déficit en el gen *Ndufs2* se puede concluir que las células glómicas del modelo adulto, ESR-NDUFS2, son más similares electrofisiológicamente a las células glómicas controles que las células de los ratones TH-NDUFS2. El hecho de que en los ratones ESR-NDUFS2, también se produzca una pérdida selectiva de la respuesta a hipoxia, conservando los parámetros electrofisiológicos normales, sugiere que la pérdida de respuesta a hipoxia no está asociada a las alteraciones en las propiedades electrofisiológicas de las células glómicas con déficit de *Ndufs2*.

- **Caracterización de las corrientes macroscópicas en células glómicas con déficit inducido de *Ndufs2***

Para el estudio comparativo de las corrientes macroscópicas de calcio y potasio en células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2 se utilizó la técnica de *patch-clamp* en la configuración de *whole-cell* (ver “Métodos”) y se aplicaron pulsos despolarizantes de diferente amplitud. La amplitud de las corrientes macroscópicas de K^+ , a potenciales muy positivos (~30-50 mV) fue significativamente mayor en las células de los ratones ESR-NDUFS2 que en la de los animales controles (Figura 27 A y B). Sin embargo, hubo una disminución, no significativa, en la amplitud de la corriente de Ca^{2+} de las células glómicas aisladas de los ratones *Ndufs2* deficientes frente a las células glómicas de los animales controles (Figura 27 C y D). Estas pequeñas variaciones en la amplitud de las corrientes no permiten explicar la pérdida selectiva de la respuesta a hipoxia de estos animales ya que no afectaron a la respuesta de estas células a hipercapnia o a alto potasio registrada con microfluorimetría o con amperometría (Figura 24 y 25).

1.3. La deficiencia inducida de *Ndufs2* inhibe la señalización del complejo mitocondrial I durante hipoxia en las células glómicas

Los estudios previos realizados en los ratones TH-NDUFS2 nos llevaron a sugerir que durante la hipoxia se produce un enlentecimiento de la CTE en las células glómicas del CC, que provoca una fuga de electrones a nivel del CMI produciendo ROS y acumulando NADH (Fernández-Agüera *et al.* 2015). El incremento de NADH y ROS, característico de las células glómicas controles durante hipoxia, estaba abolido en las células de ratones TH-NDUFS2, motivo por el cual se propuso que ambas moléculas son las responsables de señalar a la

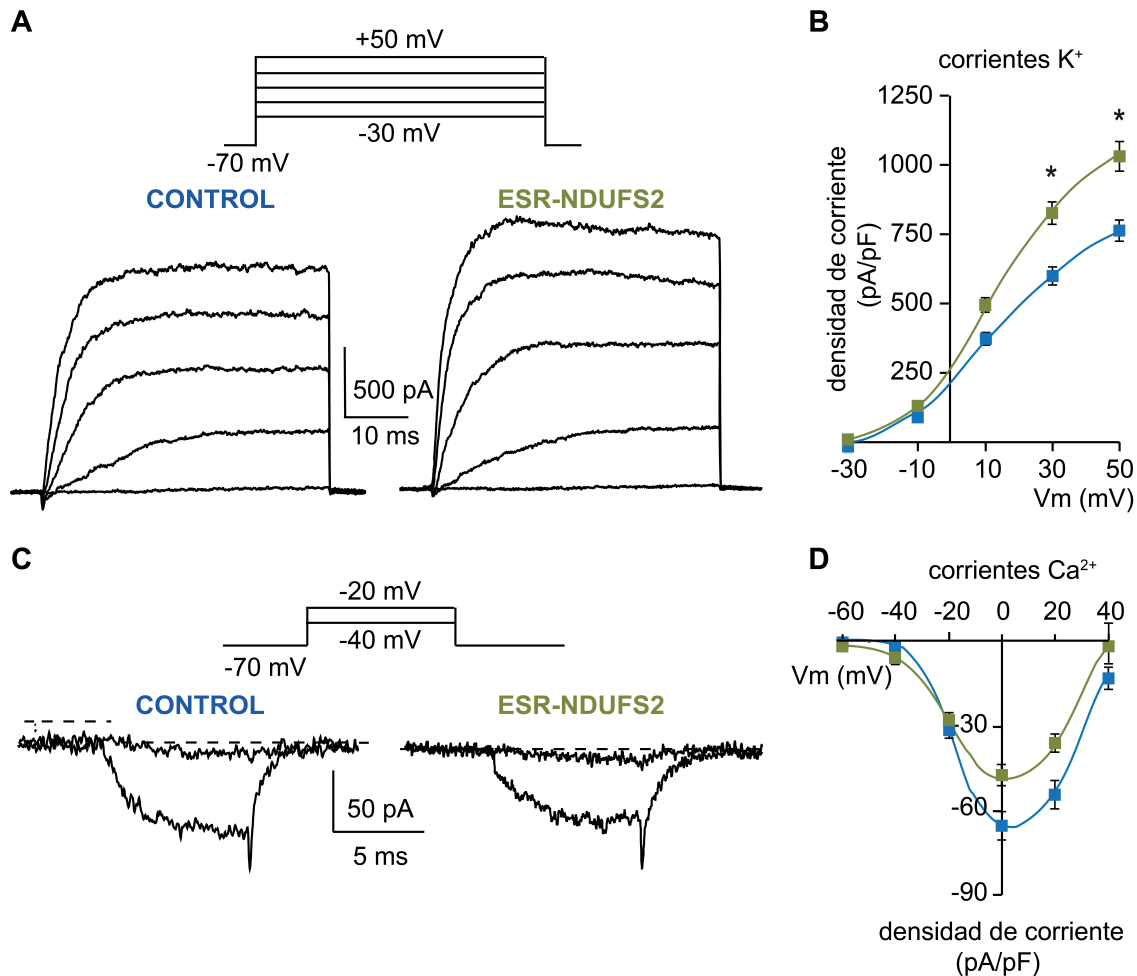


Figura 27. Corrientes de Ca^{2+} y K^{+} voltaje-dependientes de las células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2. (A) Registros representativos de corrientes de K^{+} de células glómicas controles (azul) y ESR-NDUFS2 (verde). Se aplicaron pulsos despolarizantes (50 ms) secuenciales desde -30 mV hasta +50 mV, desde un potencial de reposo de -70 mV. (B) Relación entre la densidad de corriente de K^{+} (pA/pF) y el potencial de membrana (mV) en células glómicas controles y ESR-NDUFS2 (controles: 18/9 células/ratones y ESR-NDUFS2: 16/8 células/ratones). (C) Registros representativos de corrientes macroscópicas de Ca^{2+} durante un pulso despolarizante a +10 mV desde -70 mV. (D) Relación entre la densidad de corriente de Ca^{2+} (pA/pF) y el potencial de membrana (Vm) en células glómicas controles y ESR-NDUFS2 (controles: 17/8 células/ratones y ESR-NDUFS2: 18/9 células/ratones). Los datos representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$.

membrana e inhibir los canales de potasio produciendo la despolarización en respuesta a hipoxia (Fernández-Agüera *et al.*, 2015); (ver “Introducción”). Sin embargo, una limitación del modelo embrionario, TH-NDUFS2, es que sus células glómicas presenta un alto nivel basal de NADH y ROS en comparación con las células glómicas de ratones controles (Fernández-Agüera *et al.*, 2015). El elevado ratio de NADH/NAD⁺ y el alto nivel de oxidación celular del modelo embrionario podría ser responsables de la insensibilidad a hipoxia aguda de las células glómicas en los ratones TH-NDUFS2, siendo la hipoxia incapaz de incrementar aún más los niveles de estas moléculas o bien porque un alto nivel de NADH inhibe las deshidrogenasas del ciclo de Krebs y parando el metabolismo oxidativo.

Estudiamos en primer lugar, si la delección en la vida adulta del gen *Ndufs2* afectaba menos a los niveles basales de NADH y ROS comparativamente con el modelo embrionario, y en segundo lugar, si la respuesta a hipoxia medida como incremento de NADH y ROS, estaba abolida en el caso de los ratones ESR-NDUFS2 igual que se había descrito con los ratones TH-NDUFS2 (Fernández-Agüera *et al.*, 2015).

1.3.1. Incremento de NADH durante hipoxia en el complejo mitocondrial I

La medida de los niveles basales de NADH (ver “Métodos”) en células glómicas de ratones ESR-NDUFS2 mostraron que el nivel de NADH basal era significativamente menor que el de los ratones TH-NUDFS2, aunque seguía siendo significativamente mayor que el de los ratones controles (Figura 28 A). Sin embargo, el incremento de NADH característico de las células glómicas controles durante hipoxia aguda no se registró en las células glómicas de los ratones ESR-NDUFS2 (Figura 28 B-D) al igual que ocurría cuando las células glómicas de los ratones TH-NDUFS2 eran expuesta a hipoxia (Fernández-Agüera *et al.*, 2015). Estos resultados sugieren que el elevado ratio de NADH/NAD⁺ descrito en los ratones TH-NDUFS2 no es el responsable de que las células glómicas de este modelo pierdan su capacidad de responder a hipoxia, ya que en el modelo ESR-NDUFS2, con niveles significativamente menores del ratio NADH/NAD⁺, tampoco mostraban un incremento de NADH en respuestas a hipoxia.

Para validar el modelo ESR-NDUFS2, y comprobar la disminución de la actividad del CMI tras el tratamiento con TMX, se midió el efecto de la aplicación rotenona, un inhibidor el CMI (ver “Introducción”), sobre la señal de NADH de las células glómicas de ratones ESR-NDUFS2. Los resultados mostraron que mientras que las células glómicas controles presentaban un incremento notable de NADH en respuesta a rotenona, en las células glómicas aisladas con déficit inducido de *Ndufs2* este incremento se encontraba drásticamente reducido (Figura 29). Estos datos apoyan que el CMI es el responsable del incremento de NADH que observamos en las células glómicas aisladas durante la exposición a hipoxia. Además, indican que las células con déficit inducido de *Ndufs2* no presentan un CMI funcional.

Finalmente, para comprobar que el incremento de NADH que medimos en células glómicas control durante hipoxia se debe a la disminución de oxígeno, estudiamos la correlación entre la amplitud de la respuesta a NADH y distintas PO₂ extracelular. Los resultados mostraron un incremento gradual de la autofluorescencia de NADH tras disminuir el porcentaje de oxígeno ambiental por debajo de 60 mmHg (Figura 30). La curva hiperbólica obtenida, donde se representa la respuesta de NADH en función del porcentaje de O₂, fue similar a la publicada

por otros autores (Duchen y Biscoe, 1992b; Buckler y Turner, 2013). Esta relación es además similar a la que existe entre la actividad ventilatoria y los niveles de PaO₂ en sangre en animales intactos (Rhoades y Bell, 2012).

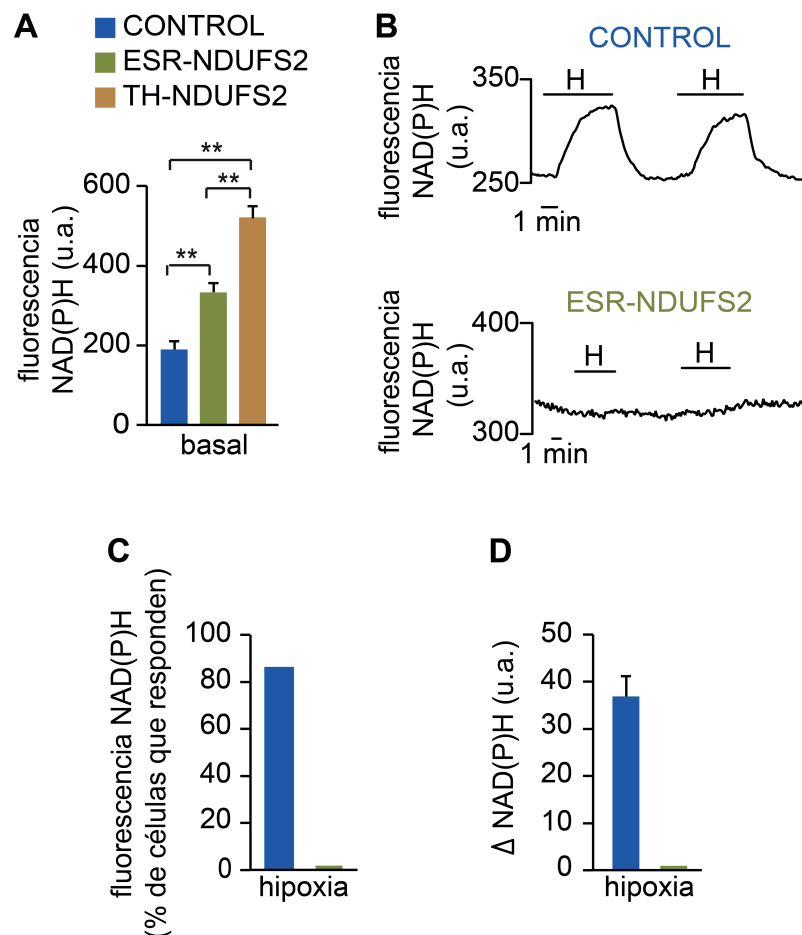


Figura 28. La deficiencia inducida de *Ndufs2* inhibe la señalización del MCI durante la hipoxia aguda. (A) Promedio de la autofluorescencia basal de NADH en células glómicas de ratones controles (azul), ESR-NDUFS2 (verde) y TH-NDUFS2 (marrón). (control: 190,13 ± 0,03 u.a. de 59/12 células/ratones; ESR-NDUFS2: 335,69 ± 23,71 u.a. en 34/4 células/ratones y TH-NDUFS2: 526,09 ± 30,62 u.a. en 60/5 células/ratones). (B) Registros representativos de cambios de NADH en respuesta a hipoxia en células controles y en células ESR-NDUFS2 (C) Porcentaje de células que incrementan el NADH bajo una condición de hipoxia en ratones controles y ESR-NDUFS2 (control: 59/12 células/ratones y ESR-NDUFS2: 34/4 células/ratones). Nótese que ninguna de las células del animal ESR-NDUFS2 registradas (n=34) responde a hipoxia. (D) Cuantificación del incremento de autofluorescencia de NADH inducida por hipoxia en células controles y en células ESR-NDUFS2 (control: 36,48 ± 4,29 u.a. en 51/12 células/ratones y ESR-NDUFS2: 0 u.a. en 34/4 células/ratones). Los datos representan la media ± SEM. u.a., unidades arbitrarias.

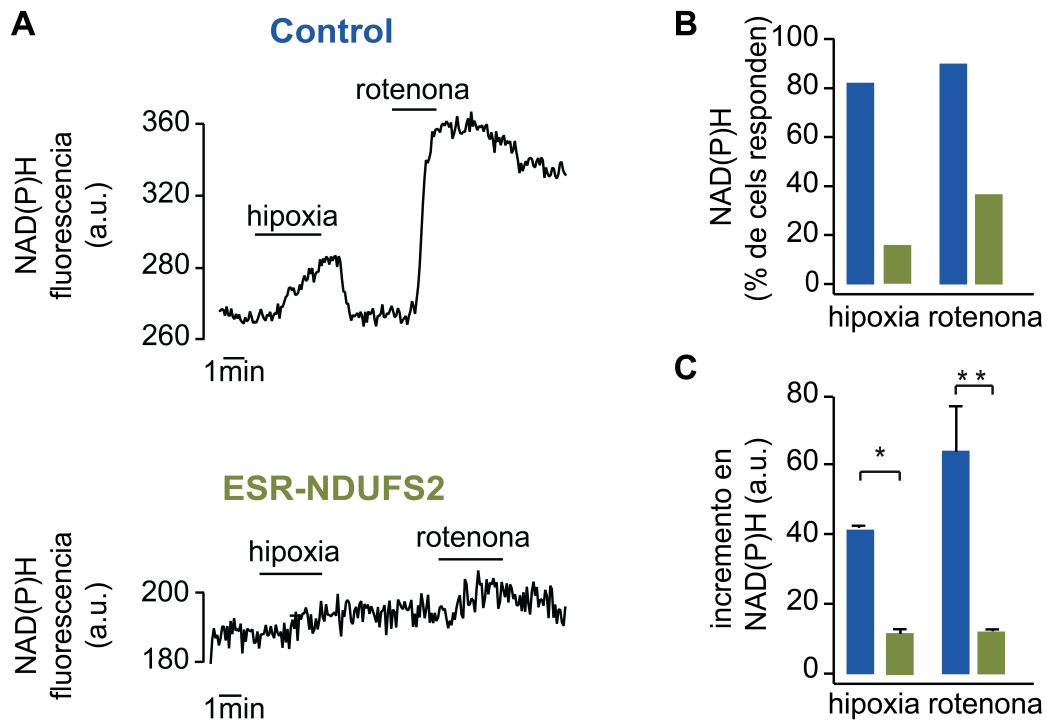


Figura 29. Inhibición de la acumulación de NADH inducido por rotenona en células con déficit inducido de *Ndufs2*. (A) Registros representativos de la señal de NADH acumulada en respuesta a hipoxia y a rotenona (1 μ M) en células glómicas de ratones controles (arriba) y en células de ratones ESR-NDUFS2 (abajo). (B) Porcentaje de células que tuvieron un incremento de NADH en respuesta a hipoxia y a rotenona en ratones controles y ESR-NDUFS2 (control, azul: 13/6 células/ratones; y ESR-NDUFS2, verde: 24/6 células/ratones). (C) Cuantificación del incremento de NADH inducido por hipoxia o rotenona en animales controles o en animales ESR-NDUFS2 (control: hipoxia $40,6 \pm 11,7$ u.a. en 11/6 células/ratones; rotenona $68,5 \pm 13,5$ u.a. en 12/6 células/ratones y ESR-NDUFS2: hipoxia $11,2 \pm 1,9$ u.a. en 7/6 células/ratones; rotenona $12,7 \pm 2,2$ u.a. en 11/6 células/ratones). Los datos representan la media \pm SEM. u.a. unidades arbitrarias. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

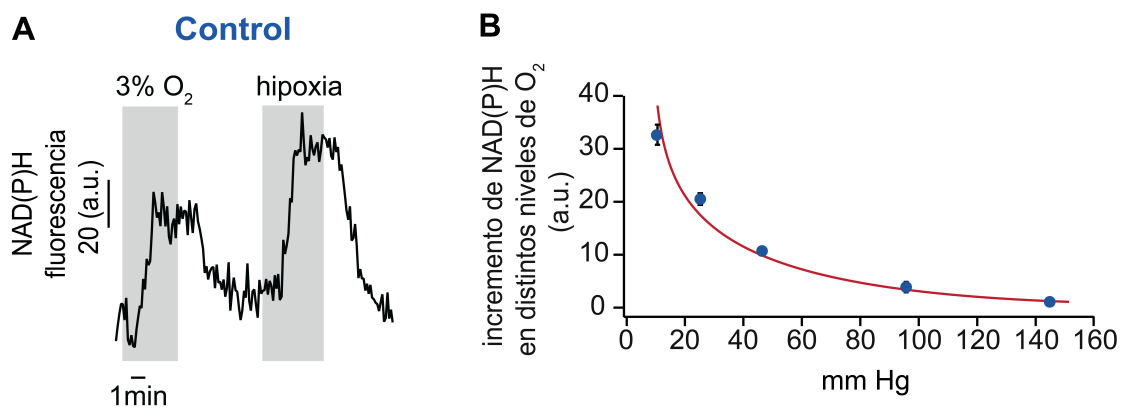


Figura 30. Respuesta gradual de NADH a distintos niveles de presión de oxígeno. (A) Registro representativo del cambio de la autofluorescencia de NADH en células glómicas a distintos niveles de hipoxia ($PO_2 \sim 12,5$ mmHg) y 3% de O₂ ($PO_2 \sim 27,5$ mmHg) en la cámara de registro. (B) Cuantificación de la relación entre la amplitud de la señal de NADH (eje Y) y los distintos niveles de O₂ (eje X) en células glómicas de ratones controles. Nivel de PO_2 : Basal o 145 mmHg (0 u.a. en 46/13 células/ratones); 90 mmHg o 12% O₂ ($3,7 \pm 1,9$ u.a. en 10/2 células/ratones), 45 mmHg o 6% O₂ ($11,0 \pm 1,5$ u.a. en 16/2 células/ratones); 27.5 mmHg o 3% O₂ ($17,6 \pm 1,9$ u.a. en 45/13 células/ratones); 12,5 mmHg o hipoxia ($23,16 \pm 3,6$ u.a. en 46/13 células/ ratones). La curva hiperbólica está trazada a ojo. Los datos representan la media \pm SEM. u.a. unidades arbitrarias.

1.3.2. Efecto de la regeneración de NAD^+ sobre la respuesta a hipoxia aguda

Como se describió en el apartado anterior, aunque los niveles de NADH basales del animal ESR-NDUFS2 son más bajos que los del modelo embrionario, éstos están elevados con respecto a los de los animales controles. Para descartar que la falta de respuesta a hipoxia pudiera deberse a unos niveles aun altos del ratio NADH/NAD^+ decidimos modificar dicho ratio utilizando agentes aceptores de electrones, para ver si estos eran capaces de recuperar la respuesta a hipoxia en los modelos animales con delección de *Ndufs2*. Los agentes empleados fueron α -cetobutirato (α KB) y piruvato, los cuales son convertidos, respectivamente, a α -hidroxibutirato (α HB) y a lactato, por la LDH y otras deshidrogenasas en el espacio intracelular (Figura 31). Estas reacciones consumen NADH y regeneran el NAD^+ requeridos para la función de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs (Sullivan *et al.*, 2015). Estos agentes se administraron tanto de forma aguda como crónica.

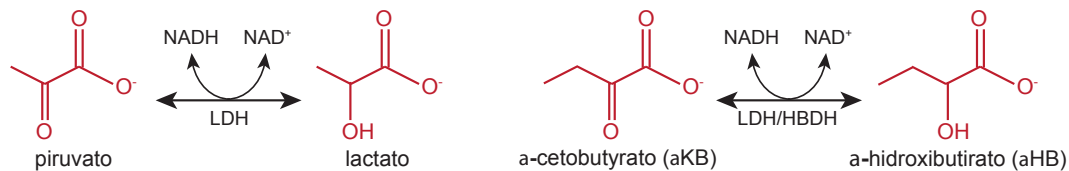


Figura 31. Agentes regeneradores de NAD^+ . Reacciones enzimáticas de piruvato y a-cetobutirato (α KB) como regeneradores de NAD^+ .

1.3.2.1. Tratamiento agudo con regeneradores de NAD^+

En primer lugar, las células glómicas aisladas fueron expuestas de forma aguda, durante 5 min, a α KB y a piruvato y se midió la autofluorescencia de NADH para comprobar su capacidad para regenerar NAD^+ . Los resultados que obtuvimos mostraron que tanto en las células glómicas de los ratones controles como en las de los ratones deficientes de *Ndufs2* (TH-NDUS2 y ESR-NDUFS2), hubo una rápida disminución de los niveles de NADH basales en presencia de α KB y de piruvato. Esta disminución fue significativamente mayor en el caso de las células glómicas con déficit en *Ndufs2* que en las células controles, llegando los niveles basales de NADH de las células con déficit de *Ndufs2* a valores similares al registrado en los ratones controles en normoxia (Figura 32 A y B). Además, se registraron los cambios de NADH inducidos por hipoxia en presencia de α KB y piruvato, tanto en células glómicas controles como en células con déficit de *Ndufs2*. El incremento reversible de NADH en respuesta a hipoxia se mantuvo inalterado en células de animales controles (Figura 32 A), sin embargo, la bajada de los niveles basales de NADH inducida por estos agentes no permitió recuperar la respuesta a hipoxia en las células glómicas deficientes para el gen *Ndufs2* (Figura

32 A y C). No obstante, la respuesta a hipoxia de las células glómicas controles fue significativamente menor en presencia de α KB que cuando estaban expuesta a solución control o con piruvato (Figura 32 A y C); esto puede deberse a que el α KB se metaboliza a α HB consumiendo NADH, sin embargo, el piruvato puede metabolizarse a lactato y consumir NADH o entrar en el ciclo de Krebs y favorecer la producción de NADH (Sullivan *et al.*, 2015) (ver “Discusión”).

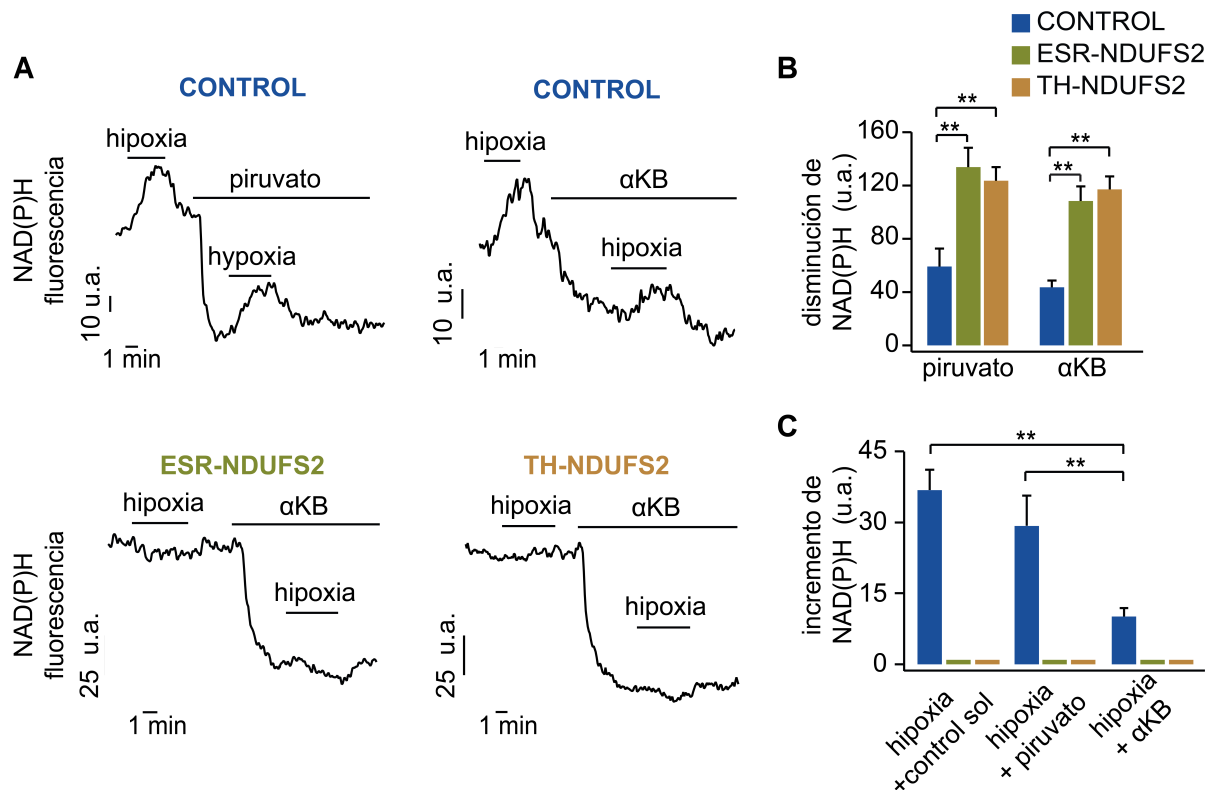


Figura 32. Regeneración aguda de NAD⁺ y capacidad de respuesta a la hipoxia de las células glómicas de ratones controles y deficientes en *Ndufs2*. (A) Registros representativos que ilustran la disminución de los niveles basales de NADH tras la exposición aguda a 10 mM piruvato (izquierda) y 2,5 mM α KB (derecha) en células glómicas de ratones controles (arriba), ESR-NDUFS2 (abajo, izquierda) y TH-NDUFS2 (abajo, derecha). Nótese como el aumento reversible de la fluorescencia de NADH en respuesta a la hipoxia se mantuvo en el caso de las células glómicas controles y no se recuperó en las células glómicas de ratones deficientes para *Ndufs2*. (B) Cuantificación de la disminución en los niveles basales de NADH producidos por la incubación aguda de células glómicas de ratones controles (azul), ESR-NDUFS2 (verde) y TH-NDUFS2 (marrón) con 10 mM piruvato y 2,5 mM α KB. Tras añadir piruvato (controles: $59,18 \pm 13,48$ u.a. en 20/6 células/ratones; ESR-NDUFS2: $133,81 \pm 14,49$ u.a. en 20/3 células/ratones y TH-NDUFS2: $123,59 \pm 10,21$ u.a. en 43/3 células/ratones) y tras añadir α KB (controles: $43,60 \pm 5,07$ u.a. en 18/6 células/ratones; ESR-NDUFS2: $108,37 \pm 10,99$ u.a. en 19/3 células/ratones y TH-NDUFS2: $117,10 \pm 9,75$ u.a. en 44/3 células/ratones). (C) Incremento de NADH durante hipoxia en distintas soluciones. Solución control (control: $36,86 \pm 4,29$ u.a. en 51/12 células/ratones; ESR-NDUFS2: 0 u.a. en 34/4 células/ratones y TH-NDUFS2: 0 u.a. en 60/5 células/ratones), Solución con piruvato (control: $29,30 \pm 6,34$ u.a. en 20/6 células/ratones; ESR-NDUFS2: 0 u.a. en 20/3 células/ratones y TH-NDUFS2: 0 u.a. en 43/3 células/ratones) y solución con 2,5 mM α KB (control: $10,11 \pm 1,87$ u.a. en 15/6 células/ratones; ESR-NDUFS2: 0 u.a. de 19/3 células/ratones y TH-NDUFS2: 0 u.a. en 44/3 células/ratones). u.a., unidades arbitrarias. Los datos representan la media \pm SEM. ** $p < 0,001$.

1.3.2.2. Tratamiento crónico con regeneradores de NAD⁺ en células glómicas controles

El tratamiento agudo de células deficientes en *Ndufs2* con aceptores de electrones lograba disminuir notablemente los niveles de NADH, como se describió anteriormente, hasta alcanzar niveles próximos a los basales registrados en células controles. No obstante, esta disminución aguda de NADH, no fue capaz de recuperar la respuesta a hipoxia. Para disminuir aún más el ratio NADH/NAD⁺ y mantenerlo bajo durante un tiempo antes de exponer las células glómicas deficientes en *Ndufs2* a hipoxia aguda, se cultivaron crónicamente las células glómicas controles aisladas (durante la noche) con 2,5 mM α KB. Antes de realizar los experimentos en células de animales ESR-NDUFS2, se comprobó que la incubación crónica con α KB y piruvato no afecta al estado del cultivo y por tanto a la respuesta aguda a hipoxia de animales controles. En la Figura 33 se muestran registros representativos del incremento de NADH en respuesta a hipoxia de células glómicas controles incubadas durante la noche en medio de cultivo control (A, panel superior), conteniendo 10 mM piruvato (A, panel central) o α KB 2,5 mM (A, panel inferior). Como se puede observar en las cuantificaciones, el número de células que respondían con un incremento de NADH cuando fueron expuestas a hipoxia aguda no variaba en función de haber estado o no incubada con los distintos agentes durante toda la noche (Figura 33 A y B). Sin embargo, aunque el número de células capaces de responder a hipoxia no cambió, la amplitud de la respuesta a hipoxia fue más pequeña en las células que habían sido tratadas crónicamente con α KB (Figura 33 C), de forma similar a los resultados obtenidos previamente en exposiciones agudas a este agente.

Los resultados anteriores mostraban que el incremento de NADH durante hipoxia era significativamente distinto en las células glómicas controles expuestas de forma aguda y crónicamente con 2,5 mM α KB, por lo que estudiamos si se producían variaciones en las propiedades electrofisiológicas (Figura 34) o en las corrientes macroscópicas (Figura 35) de las células glómicas tras el tratamiento crónico con este regenerador de NAD⁺. Para el registro de las propiedades electrofisiológicas usamos la técnica de *patch-clamp* en la configuración de parche perforado aplicando el protocolo de rampa en *whole-cell* (Figura 34); (ver “Métodos”). Los resultados obtenidos mostraron que no había diferencias significativas en la mayoría de los parámetros como la resistencia de entrada, el potencial de membrana y la magnitud de la corriente a -10 mV. Sin embargo, se registró que el potencial de reversión era significativamente más negativo en células que habían sido tratadas crónicamente con α KB que en células controles (Figura 34). Este parámetro está vinculado a la sensibilidad o el umbral de apertura de los canales de potasio, cuanto más negativo sea el umbral de reversión

Resultados

más sensible son los canales voltaje-dependiente de potasio a abrirse e hiperpolarizar las células. Estas modificaciones en la dependencia de potencial de los canales de potasio parecen un efecto inespecífico del α KB sin consecuencia funcional relevante.

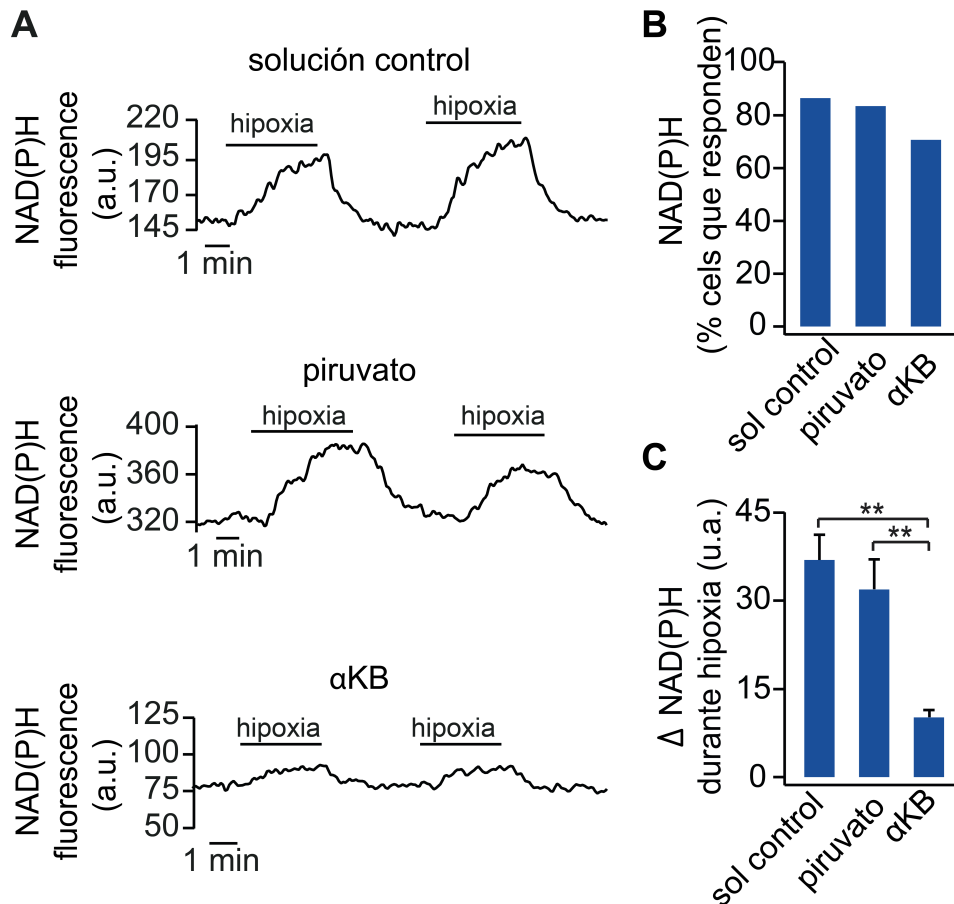


Figura 33. Mantienimiento del incremento de NADH en respuesta a hipoxia en células glómicas del cuerpo carotídeo de ratones controles incubadas crónicamente con regeneradores de electrones (NAD⁺). (A) Registros representativos del incremento en la autofluorescencia de NADH inducido por la hipoxia en células glómicas controles incubadas durante la noche en solución control (arriba), en solución con piruvato 10 mM (centro) o en solución con 2,5 mM α KB (abajo). (B) Porcentaje de células glómicas que mostraron un aumento de la fluorescencia de NADH durante hipoxia y que habían sido incubada crónicamente en solución de control (59/12 células/ratones registrados), en 10 mM piruvato (36/3 células/ratones registrados), o en solución con 2,5 mM α KB (17/3 células/ratones registrados). (C) Cuantificación del aumento de NADH inducido por hipoxia en células glómicas controles sensibles a hipoxia incubadas crónicamente en solución control ($36,86 \pm 4,29$ u.a. en 51/12 células/ratones), en solución con piruvato ($31,93 \pm 5,06$ u.a. en 30/3 células/ratones), o en solución que contiene α KB ($10,19 \pm 1,23$ u.a. en 12/3 células/ratones). u.a., unidades arbitrarias. Los datos representan la media \pm SEM. ** p < 0,001.

El registro de las corrientes macroscópicas voltaje-dependiente de calcio y de potasio en células tratadas crónicamente con α KB se realizó utilizando la técnica de *patch-clamp*, en la configuración de *whole-cell* usando un protocolo de pulsos despolarizantes en *voltage-clamp* (ver “Métodos”). Se observó que únicamente se producían cambios significativos

Resultados

respecto a células incubadas en medio control en la amplitud de las corrientes de K^+ y Ca^{2+} a potenciales muy positivos (~ 30 - 50 mV, para las corrientes de K^+ y ~ 0 - 20 mV, para las corrientes de Ca^{2+}) (Figura 35).

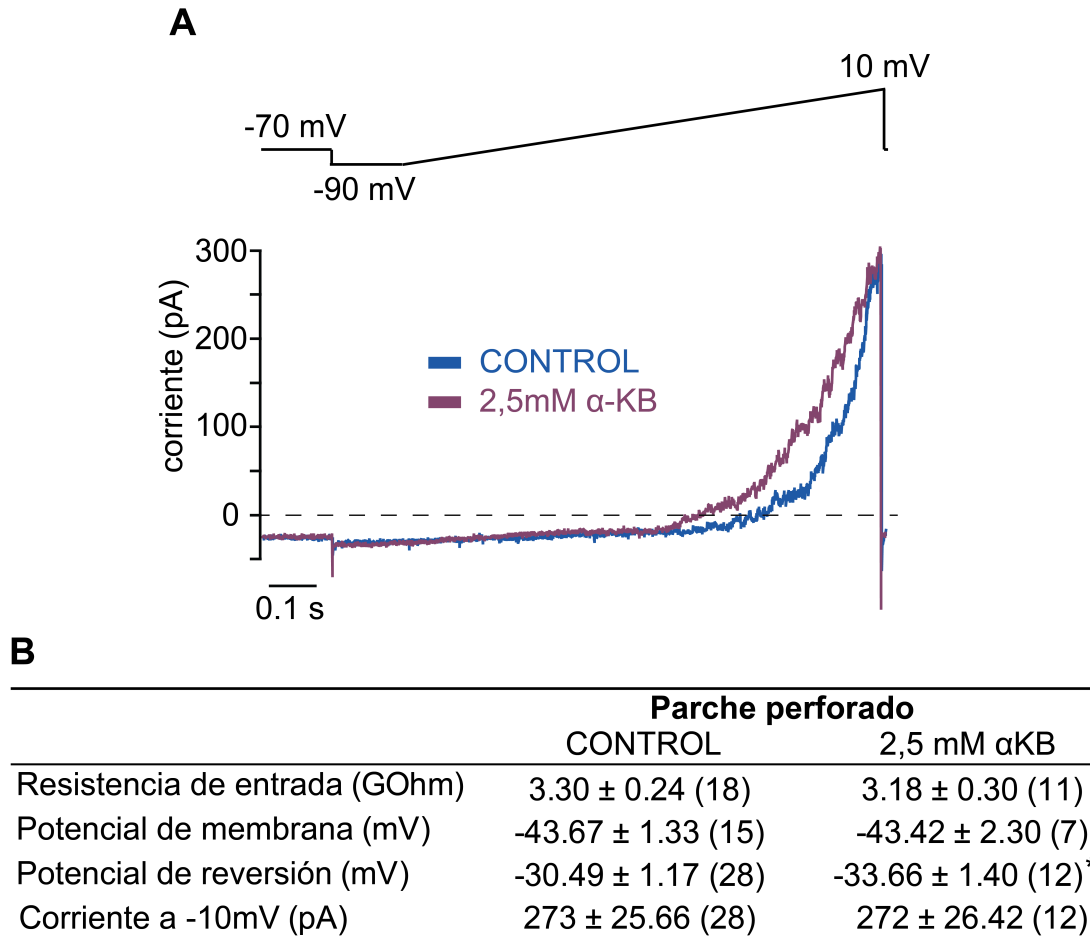


Figura 34. Propiedades electrofisiológicas de las células glómicas controles tratadas crónicamente con α KB. (A, arriba) Protocolo de rampa de voltaje aplicado a las células glómicas para estudiar las corrientes con la técnica de parche perforado. (A, abajo) Corrientes registradas en células controles (azul) y tratadas crónicamente con 2,5 mM α KB (morado). (B) En la tabla los datos se presentan como los valores medios \pm error estándar; el número de células registradas se muestran entre paréntesis. * $p < 0,05$.

Por tanto, se puede concluir que la incubación crónica con α KB produce únicamente cambios sutiles en las propiedades electrofisiológicas de las células glómicas que no explican el menor incremento en los niveles de NADH en respuesta a hipoxia aguda que observamos tras la incubación con este agente, pensamos que estas alteraciones pueden estar relacionadas con cambios a nivel metabólico inducidos por la incubación crónica y no como consecuencia de un mal funcionamiento celular. Por este motivo decidimos estudiar el efecto de la incubación crónica con α KB en células glómicas deficientes en *Ndufs2*.

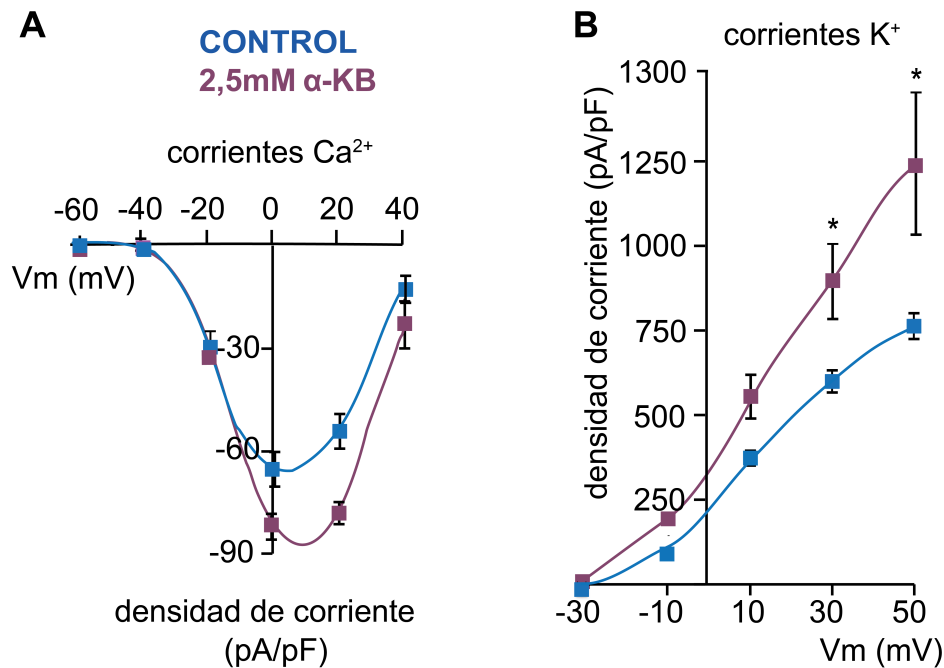


Figura 35. Corrientes de Ca²⁺ y K⁺ voltaje-dependientes de las células glómicas controles y tratadas con 2,5 mM αKB crónicamente. Relación entre la densidad de corriente (pA/pF) de calcio (A) y de potasio (B) y el potencial de membrana (mV) en células glómicas controles y tratadas con 2,5 mM αKB. Corrientes de calcio (control: 14/7 células/ratones e incubadas con αKB: 7/2 células/ratones) y corriente de potasio (control: 18/9 células/ratones e incubadas con αKB: 16/8 células/ratones). Los datos representan la media ± SEM. * p < 0,05.

1.3.2.3. Tratamiento crónico con regeneradores de NAD⁺ en células glómicas ESR-NDUFS2

Las células glómicas (control y deficientes en *Ndufs2*) que fueron tratadas crónicamente con 2,5 mM αKB mostraron una disminución de los niveles basales de NADH, siendo particularmente evidente en las células glómicas de los ratones ESR-NDUFS2 (ver línea discontinua en la Figura 36 A), donde los niveles basales de NADH fueron incluso inferiores a los de las células de ratones controles sin tratamiento con αKB. Sin embargo, incluso con bajos niveles basales de NADH, las células con un CMI no funcional, mostraron una abolición completa del incremento reversible NADH inducido por hipoxia característico de células controles (Figura 36 B y C).

Para confirmar que la abolición de la respuesta a hipoxia en células glómicas con déficit inducido de *Ndufs2* se debe a la falta de funcionalidad del CMI y no a un mal funcionamiento de la CTE se incubaron las células con dimetil succinato (DMSus), sustrato del CMII que favorece la activación de la CTE vía CMII-CMIV (ver Figura 37 A). Los resultados mostraron que incluso tras la incubación crónica de las células glómicas de ratones ESR-NDUFS2 con αKB, que disminuye los niveles basales de NADH, y con DMSuc, que activa la CTE, la respuesta a hipoxia de estas células no se recuperó (Figura 37 B y C).

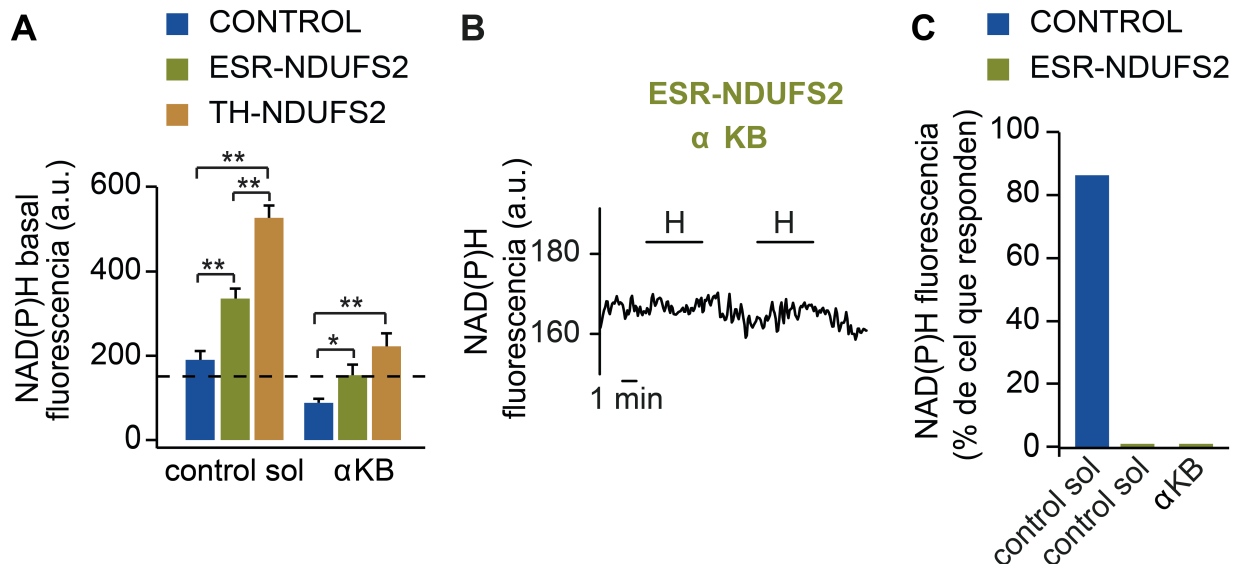


Figura 36. La pérdida de la respuesta a hipoxia, medida con NADH, en las células glómicas ESR-NDUFS2 no es recuperada por los regeneradores de aceptores de electrones NAD⁺. (A) Cuantificación de los niveles basales de NADH en células glómicas de los tres modelos de ratones (indicado con distintos colores) incubados durante la noche en solución de control (los datos de los niveles basales de NADH son los mismo que los de la Figura 28 A, se muestra para comparar) o en solución con 2,5 mM αKB (control: 88,69 ± 8,98 u.a. en 17/3 células/ratones; ESR-NDUFS2: 154,23 ± 25,64 u.a. en 12/3 células/ratones; TH-NDUFS2: 222,27 ± 30,48 u.a. en 22/3 células/ratones) Nótese que los niveles de NADH en las células de ratones ESR-NDUFS2 incubados en 2,5 mM αKB (línea discontinua) estaban por debajo de los niveles medidos de células glómicas controles sin incubación (B) Registro representativo de los cambios de la autofluorescencia NADH inducidos por hipoxia en células glómicas de ratones ESR-NDUFS2 después de estar incubados crónicamente con αKB. (C) Porcentaje de células que mostraron un incremento de autofluorescencia de NADH durante hipoxia en células glómicas de ratones control y ratones ESR-NDUFS2 (control: 59/12 células/ratones; ESR-NDUFS2: incubados en solución de control 34/4 células/ratones, con solución con αKB 12/3 células/ratones). Nótese que ninguna célula de ratones ESR-NDUFS2 responde a hipoxia. u.a., unidades arbitrarias. Los datos representan la media ± SEM. * p < 0,05 ** p < 0,001.

Además de estudiar como afectaba la incubación con aceptores de electrones a la respuesta a hipoxia medida como incremento de NADH, una de las especies señalizadoras de la respuesta a hipoxia en células glómicas, se estudió si esta incubación afecta a la activación de las células glómicas midiendo el incremento de calcio intracelular. La medida del incremento de calcio intracelular registrado en células glómicas ESR-NDUFS2 aisladas e incubadas crónicamente con αKB, mostraba que el aumento de Ca²⁺ citosólico en respuesta a hipoxia se mantuvo abolido (Figura 38 A, izquierda); tampoco se rescató la capacidad de responder a hipoxia de estas células cuando se incubaron conjuntamente con αKB y DMSuc (Figura 38 A, derecha). La cuantificación de los experimentos demuestra que la respuesta a hipoxia en las células ESR-NDUFS2 estaba abolida en las tres condiciones de estudio: con solución control, con αKB, y con αKB y DMSuc juntos. Además, aunque la amplitud de la respuesta a hipercapnia fue menor cuando las células se incubaron con αKB y DMSuc juntos,

Resultados

todas las células fueron capaces de responder a hipercapnia en las 3 condiciones, demostrando que la señalización de calcio no se veía afectada en estas células tras la incubación crónica con α KB o con α KB y DMSuc juntos. Estos hallazgos apoyan nuestra propuesta de que la actividad de MCI es esencial para la señalización de hipoxia aguda por quimiorreceptores periféricos y que, en células deficientes en CMI, la regeneración de aceptores de electrones y la administración exógena de sustratos permeables del CMII (DMSuc), que re-activa la CTE, no recupera la respuesta a la hipoxia en células glómicas aisladas de ratones ESR-NDUFS2.

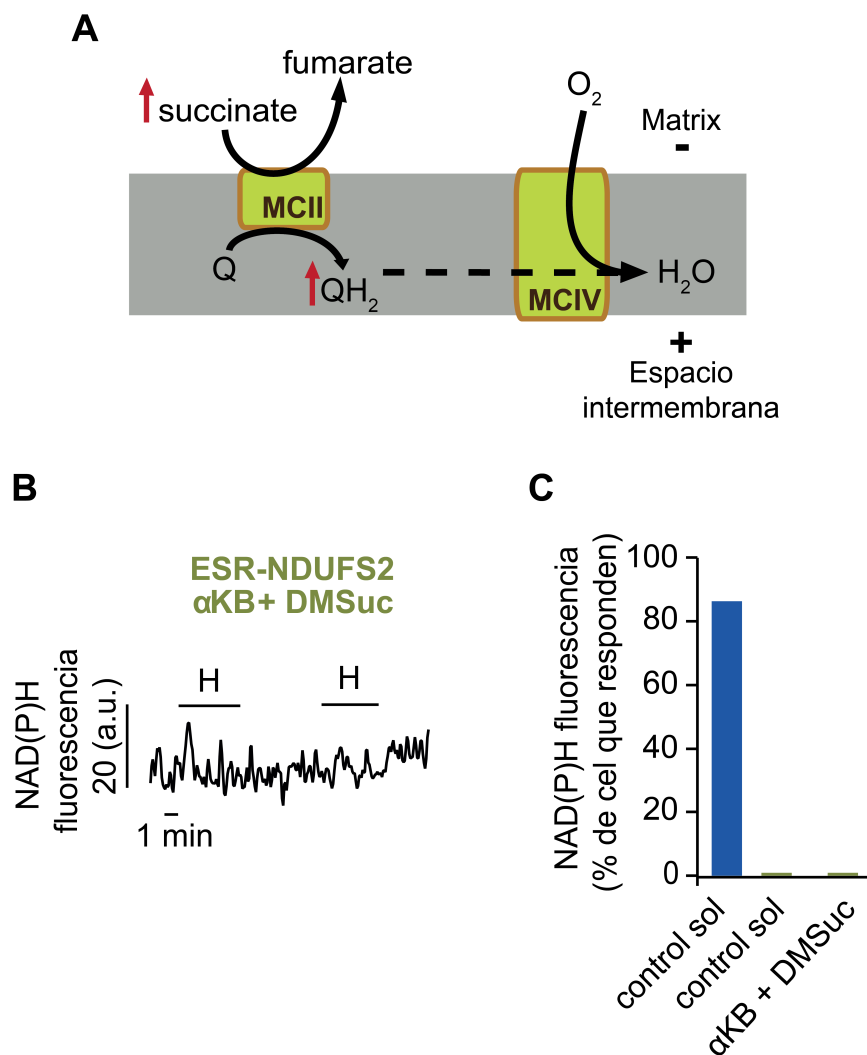


Figura 37. El dimetil succinato (DMSuc), sustrato del CMII, favorece la activación de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. (A) Esquema de una cadena de transporte mitocondrial en ratones ESR-NDUFS2 donde el CMI no se ensambla y como creemos que afecta un incremento del sustrato del CMII añadiendo DMSuc. (B) Registro representativo de los cambios de la autofluorescencia NADH inducidos por hipoxia en células glómicas de ratones ESR-NDUFS2 después de estar incubados durante la noche con α KB y dimetil succinato (DMSuc). (C) Porcentaje de células que mostraron un incremento de autofluorescencia de NADH durante hipoxia en células glómicas de ratones control y ratones ESR-NDUFS2 (control: 59/12 células/ratones y ESR-NDUFS2: incubados en solución control en 34/4 células/ratones y con solución con α KB + DMSuc en 19/3 células/ratones).

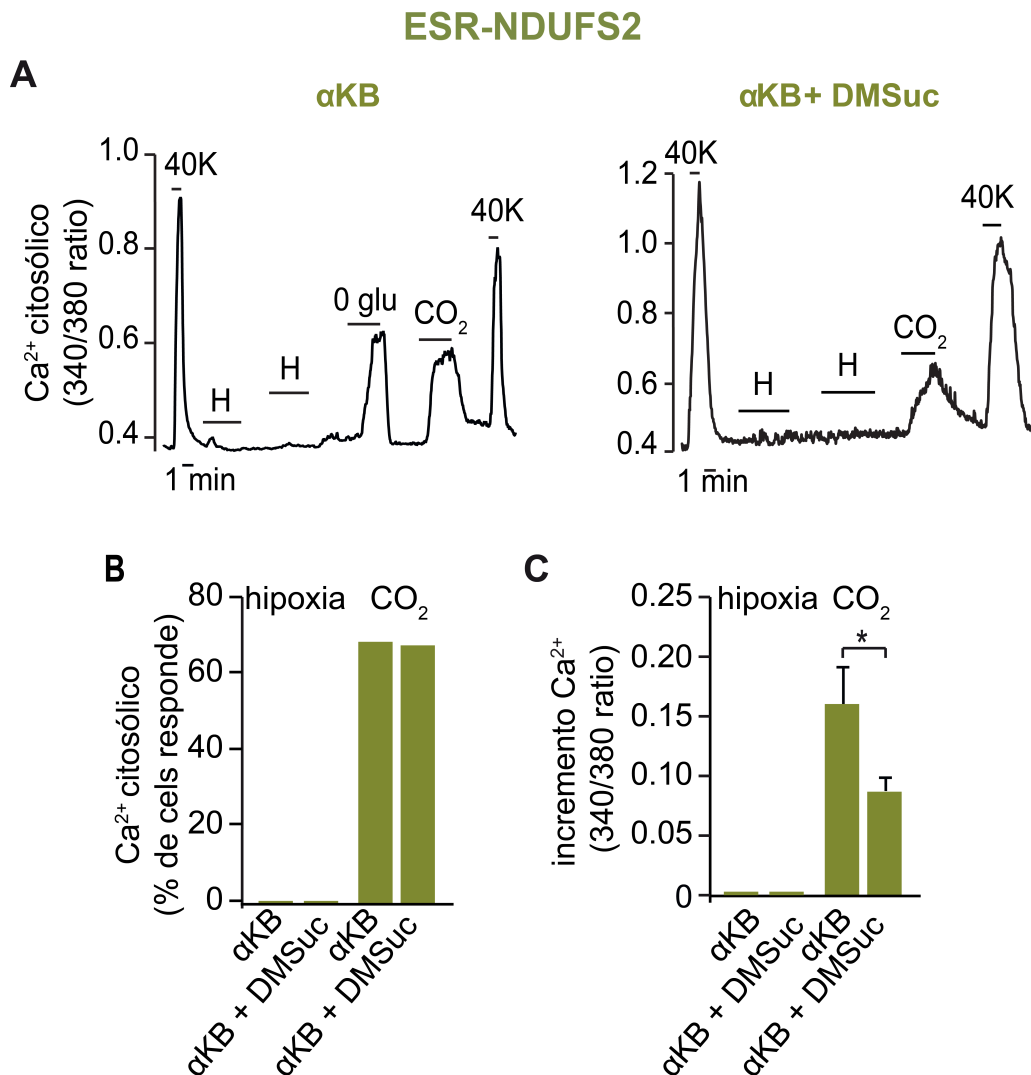


Figura 38. La pérdida de la respuesta a hipoxia, medida como incremento de calcio intracelular, en las células glómicas deficientes en *Ndufs2* no se recupera por los regeneradores de NAD^+ y ni por la activación de la CTE mediante la incubación con DMSuc. (A) Registro representativo del cambio en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ en células glómicas de ratones ESR-NDUFS2 incubados crónicamente con 2,5 mM α KB (izquierda) o 2,5 mM α KB + 5 mM DMSuc (derecha). (B) Porcentaje de células glómicas de ratones ESR-NDUFS2 que mostraron un aumento de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ durante hipoxia o hipercapnia tras haber sido incubado durante toda la noche con α KB (hipoxia: 15/4 células/ratones y CO_2 : 13/3 células/ratones) o α KB + DMSuc (hipoxia y CO_2 : 25/3 células/ratones). (C) Cuantificación del incremento del $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ de células glómicas de ratones ESR-NDUFS2 durante hipoxia o hipercapnia tras haber sido incubado crónicamente con α KB (hipoxia: 0 u.a. y CO_2 : $0,16 \pm 0,03$ u.a. en 9/3 células/ratones) o α KB + DMSuc (hipoxia: 0 u.a. y CO_2 : $0,087 \pm 0,011$ u.a. en 17/3 células/ratones). Los datos representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$.

1.3.3. Incremento de los niveles de ROS en el espacio intermembrana durante hipoxia

1.3.3.1. Estado de oxidación basal en las células glómicas de ratones ESR-NDUFS2

Se ha descrito en los mutantes del CMI y CMII un aumento de la producción de ROS debido a la fuga de electrones en intermediarios reducidos de la CTE (Fernández-Agüera *et al.*, 2015; Díaz-Castro *et al.*, 2012). El nivel basal de ROS fue hasta 3 veces superior en

células glómicas TH-NDUFS2 al que se registró en las células glómicas de ratones controles (línea discontinua marrón en Figura 39 B) (Fernández-Agüera *et al.*, 2015). Para comprobar el estado de oxidación basal de las células glómicas de ratones ESR-NDUFS2, se infectaron las rodajas de CC con la sonda *cyto-roGFP* (ver “Métodos”). Los resultados obtenidos mostraron que el nivel de ROS basal era mucho menor en ratones ESR-NDUFS2 que el de las células de ratones TH-NDUFS2, siendo similar al estado de oxidación de las células glómicas controles (Figura 39).

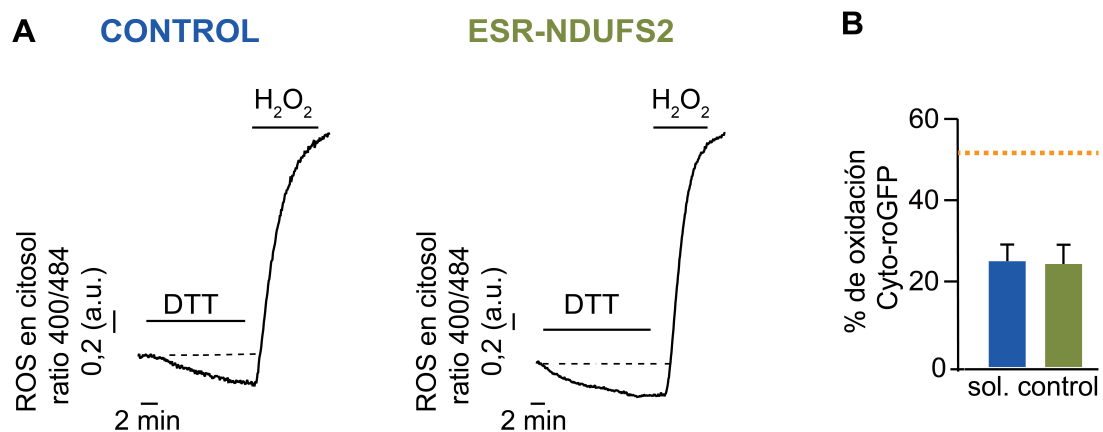


Figura 39. Nivel de oxidación basal de las células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2. (A) Cambios en ROS citosólico en células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2 infectadas con la proteína *cyto-roGFP* en presencia de 1 mM ditioneitol (DTT) y 0,1 mM H₂O₂. (B) Nivel de oxidación citosólica (porcentaje de *cyto-roGFP* oxidado) en células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2 (controles: 20/3 células/ratones; ESR-NDUFS2: 16/3 células/ratones). Se representa con una línea discontinua marrón el estado de oxidación de las células glómicas obtenidas del modelo TH-NDUFS2 (Fernández-Agüera *et al.*, 2015). Los datos representan la media ± SEM.

1.3.3.2. Incremento de ROS de espacio intermembrana durante la exposición a hipoxia

Posteriormente estudiamos si en el modelo ESR-NDUFS2, cuyo nivel de oxidación basal es similar al de las células glómicas controles, se producía el incremento reversible del ROS en el espacio intermembrana (ROS-EIM) característico de las células glómicas controles durante hipoxia. Para ello se repitieron los experimentos realizados en el modelo TH-NDUFS2 usando el vector EIM-roGFP con un promotor dirigido genéticamente al espacio intermembrana (Fernández-Agüera *et al.*, 2015) (ver “Métodos”). Los resultados mostraron que más del 50% de las células ESR-NDUFS2 registradas no mostraron cambios en los niveles de ROS en el EIM durante la exposición a hipoxia (Figura 40 B y C) característica de células glómicas controles (Figura 40 A). Además, en las células que tuvieron alguna

respuesta, la amplitud de la señal de ROS inducida por hipoxia fue aproximadamente la mitad que la registrada en células glómicas de ratones controles (Figura 40 D).

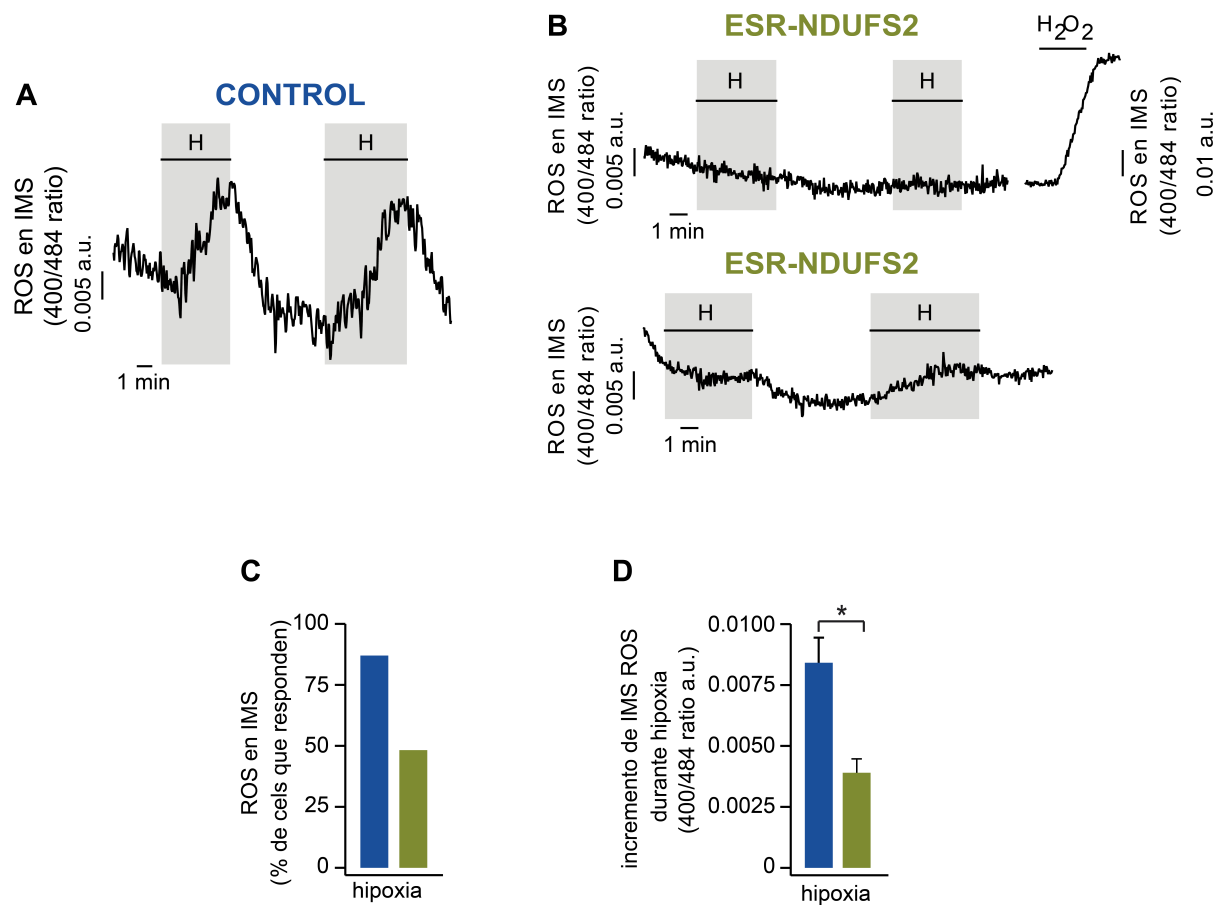


Figura 40. El déficit inducido de *Ndufs2* inhibe la señalización de ROS del complejo mitocondrial I durante hipoxia en las células glómicas del cuerpo carotideo. (A-B) Registros representativos de los cambios en ROS-EIM inducido por la hipoxia y 0,1 mM H₂O₂ en el control (azul, A) y células glómicas deficientes en *Ndufs2* (verde, B). (C) Porcentaje de células glómicas que mostraron un aumento inducido por hipoxia en ROS-EIM de ratones controles y ESR-NDUFS2 (control: 54/10 células/ratones y ESR-NDUFS2: 29/7 células/ratones). (D) Cuantificación del aumento inducido por la hipoxia en ROS-EIM de la respuesta a la hipoxia células glómicas de ratones controles y ESR-NDUFS2 (control: 0,0075 ± 0,001 u.a. en 47/10 células/ratones y ESR-NDUFS2: 0,0038 ± 0,0005 u.a. en 14/7 células/ratones). u.a., unidades arbitrarias. Los datos representan la media ± SEM. * p < 0,05.

Estas observaciones indican que la disfunción del CMI inhibe la señal de ROS generada en el EIM mitocondrial durante la hipoxia. El hecho de que el 45% de las células de los ratones ESR-NDUFS2 conservaron una respuesta de ROS a hipoxia (aunque de menor amplitud que en células controles) sugiere que todavía estaba presente alguna actividad residual de CMI en las células glómicas de ratones ESR-NDUFS2, o que la hipoxia puede inducir ROS mitocondrial en otros sitios además de en el CMI (por ejemplo, en CMIII) (ver “Discusión”). Sin embargo, las pequeñas señales de ROS observadas en células de ratones

ESR-NDUFS2 no pudieron inducir una respuesta celular (elevación de Ca^{2+} citosólico o liberación de catecolaminas) durante la exposición a hipoxia aguda (véanse Figuras 24 y 25).

1.3.3.3. Efecto del H_2O_2 intracelular sobre los parámetros electrofisiológicos de las células glómicas

El incremento de la producción de ROS y NADH durante la exposición a hipoxia actúan como señales que a su vez regulan el funcionamiento de los canales iónicos de la membrana celular. De hecho, se ha mostrado que la aplicación intracelular de oxidantes resulta en un incremento de la resistencia de entrada de las células glómicas similar al observado durante la exposición a hipoxia aguda (ver Fernández-Agüera *et al.*, 2015). Dado que consideramos este dato fundamental para sustentar la hipótesis del ROS mitocondrial como regulador de la conductancia iónica de la membrana, se diseñaron nuevos experimentos para estudiar el efecto del H_2O_2 (el ROS liberado del EIM al citosol) sobre los canales de la membrana plasmática. Para ello se usó la técnica de *patch-clamp* en la configuración de parche perforado (ver “Métodos”). Los experimentos se realizaron comparando las propiedades electrofisiológicas de las células controles y de las células glómicas dializadas con H_2O_2 (20-30 μM). Los resultados obtenidos mostraron que la resistencia de entrada de células dializadas con H_2O_2 era significativamente mayor que aquellas células registradas con la solución intracelular control (Tabla 5), mientras que el resto de los parámetros no cambiaron. Este incremento de la resistencia de entrada puede explicar la despolarización que se observa en hipoxia por una inhibición de los canales de fuga de potasio.

	Parche perforado	
	CONTROL	H_2O_2
Resistencia de entrada (G Ω m)	2,63 \pm 0,21 (6)	3,85 \pm 0,56 (6)*
Corriente (pA) a 10 mV	401,60 \pm 44,06 (6)	392,00 \pm 65,64 (6)
Corriente de inyección a -70mV (pA)	-21,25 \pm 2,03 (6)	-22,92 \pm 2,55 (6)
Potencial de reversión (mV)	-34,42 \pm 1,82 (6)	-31,50 \pm 1,38 (6)

Tabla 5. Propiedades electrofisiológicas de las células glómicas controles y las células dializadas con H_2O_2 . Los datos se presentan como los valores medios \pm error estándar; el número de células registradas se muestran entre paréntesis.

En su conjunto, los datos mostrados en este apartado 1.3.3 indican que las células glómicas con deficiencia inducible de *Ndufs2* tienen valores de los niveles basales de NADH y ROS citosólico similares al de las células glómicas controles. Aun así, exhiben una fuerte inhibición de la señalización de CMI (producción de NADH y ROS) durante la hipoxia

aguda, sugiriendo que un incremento de ambas moléculas en hipoxia, a nivel del CMI, es esencial para la respuesta a hipoxia mediada por las células glómicas del CC.

1.4. La modulación de la actividad de la succinato deshidrogenasa (CMII) afecta a la respuesta aguda a hipoxia de células glómicas de cuerpo carotideo

El modelo de quimiotransducción aguda de O₂, basado en que la acumulación de ubiquinona reducida (CoQH₂) produce un incremento de NADH y ROS a nivel del CMI que a su vez señalizan a los canales de la membrana plasmática para desencadenar la despolarización (ver “Discusión”), predice que la capacidad para responder a hipoxia en las células glómicas debe ser altamente sensible a cambios agudos en la actividad de la succinato deshidrogenasa (CMII).

Para comprobar este modelo de detección de cambios en los niveles de O₂ dependiente del ratio CoQH₂/CoQ, se trataron las células glómicas de ratones controles con dimetil malonato (DMM), un inhibidor competitivo de la succinato deshidrogenasa que es permeable a la membrana (véase Chouchani *et al.*, 2014). La exposición de células glómicas a DMM provocó una inhibición reversible de la señal de la autofluorescencia de NADH inducida por hipoxia (Figura 41 A y B). Dado que el DMM produjo por sí solo, en algunas células, pequeños cambios en la autofluorescencia de NADH de origen desconocido, se realizaron experimentos en rodajas de CC para registrar con la técnica de amperometría la secreción en respuesta a hipoxia bajo el efecto de DMM agudo (Figura 41 C). Los resultados obtenidos mostraron que con tan solo unos minutos de exposición a DMM la magnitud de la respuesta secretora a hipoxia disminuyó significativamente y que además fue un proceso completamente reversible (Figura 41 C y D). Por lo tanto, podemos afirmar que el inhibidor competitivo de la succinato deshidrogenasa disminuye significativamente, y de forma reversible, la magnitud de la respuesta a hipoxia aguda medida tanto en células glómicas aisladas como en rodajas de CC.

Para confirmar la modulación de la respuesta a hipoxia con variaciones del ratio CoQH₂/CoQ, utilizamos dimetil succinato (DMSuc), sustrato permeable del CMII, con el objeto de incrementar el ratio y como predice el modelo incrementar la respuesta a hipoxia mediada por el CC. Los resultados obtenidos mostraron que en rodajas de CC de ratones controles expuesta a DMSuc había un incremento de la magnitud de la respuesta a hipoxia secretora medida con amperometría, presumiblemente debido al aumento en la producción de CoQH₂ por CMII (Figura 42).

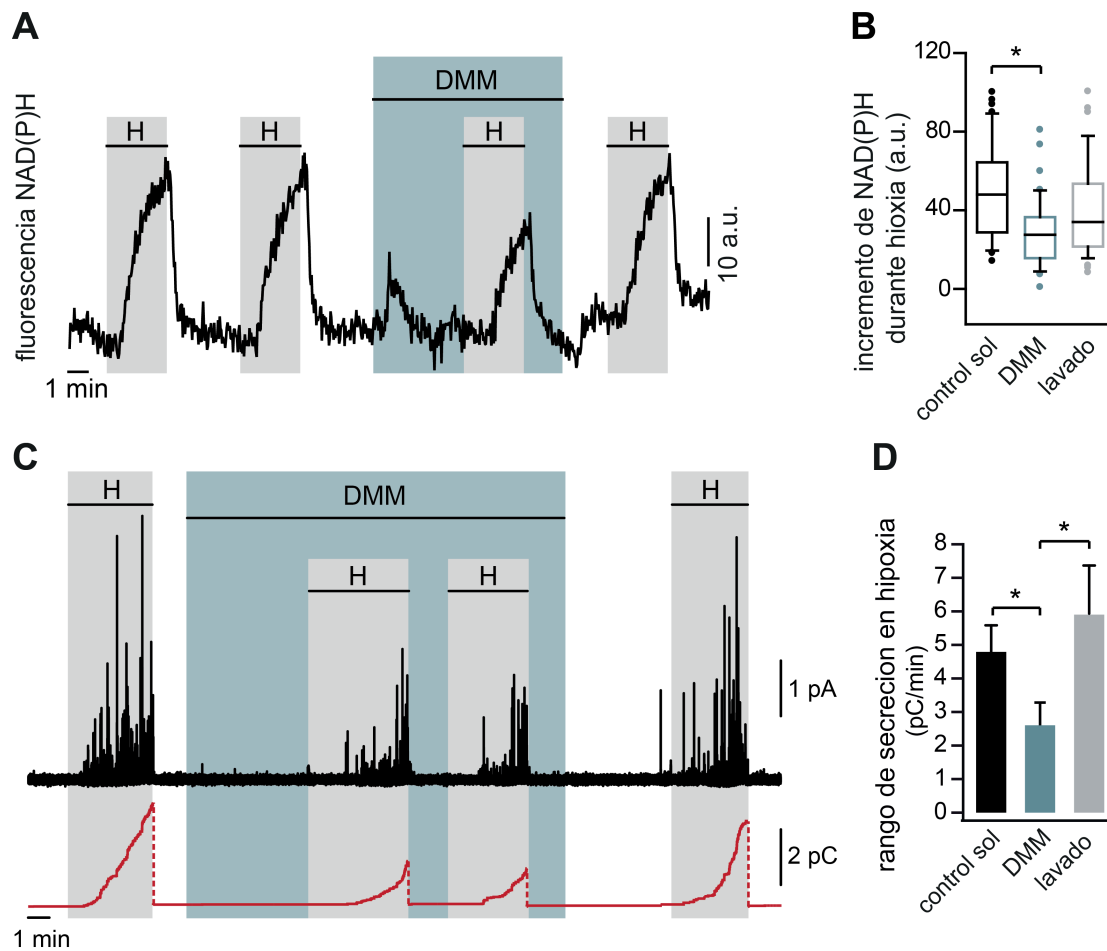


Figura 41. Modulación por DMM de las respuestas celulares a la hipoxia. (A) Registro representativo que muestra los cambios de NADH en células glómicas dispersas durante la exposición a hipoxia. La señal hipóxica de NADH se inhibe reversiblemente por la aplicación aguda de inhibidor de succinato deshidrogenasa (dimetilmalonato, DMM). (B) Diagrama de caja que muestra la cuantificación del aumento de la fluorescencia de NADH durante la hipoxia (38-43/5 células/ratones). (C) (Arriba) Registro amperométrico que ilustra la respuesta secretora a la hipoxia de las células glómicas en rodajas de cuerpo carotídeo. La respuesta secretora a hipoxia fue inhibida reversiblemente por la aplicación aguda de DMM. (Abajo) Secreción acumulada calculada como la integral de tiempo del registro amperométrico. (D) Las tasas de secreción promedio inducida por hipoxia en control, con DMM y en recuperación (control: 4788 ± 752 fC/min en 8/4 registros/cultivos; DMM: 2569 ± 728 fC/min en 8/4 registros/cultivos y recuperación: 5898 ± 1446 fC/min en 5/3 registros/cultivos). u.a., unidades arbitrarias. Los datos representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$.

Además, estudiamos el efecto sobre los parámetros electrofisiológicos de las células glómicas al aumentar succinato intracelularmente, para ello dializamos las células con un rango de entre 10 a 20 mM succinato-potásico y las comparamos con células glómicas controles. Usamos el protocolo de rampa con la configuración de parche perforado en la modalidad de *voltage-clamp* para estudiar los parámetros electrofisiológicos. Los resultados obtenidos (tabla 6) mostraron que no había diferencia significativa entre los parámetros electrofisiológicos de las células glómicas controles y las células glómicas dializadas con

succinato. No obstante, parece que existe una tendencia a que la resistencia de entrada de las células dializadas con succinato sea mayor. Con este conjunto de resultado podemos afirmar que un elevado ratio de CoQH_2/CoQ es esencial para la capacidad de responder a hipoxia aguda en las células glómicas del CC (ver “Discusión”).

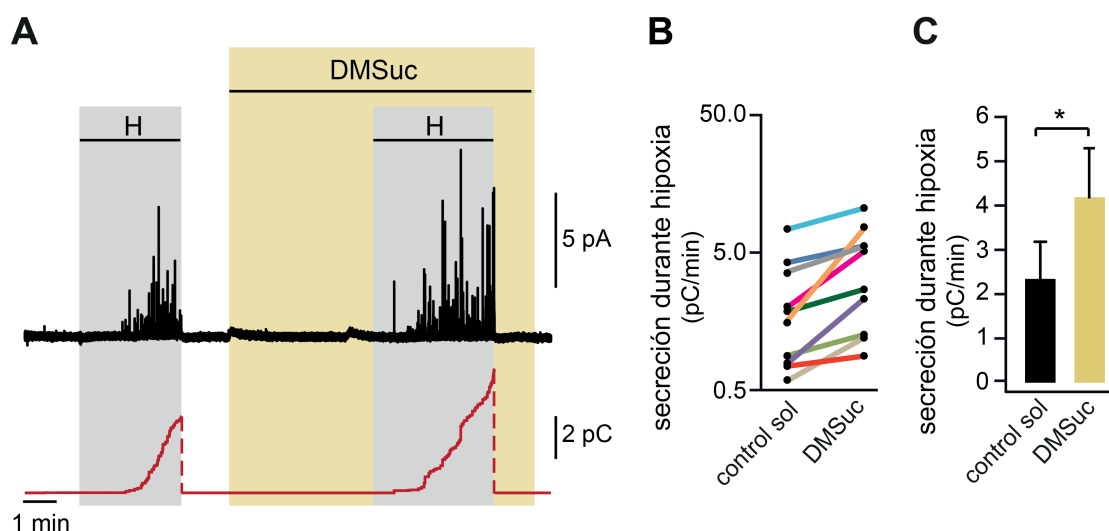


Figura 42. Activación de la CTE por DMSuc. (A) Registro representativo de amperometría donde se muestra el aumento de la respuesta secretora a hipoxia en las células glómicas en rodajas tratadas con dimetilsuccinato 5 mM (DMSuc). (B) Gráfico del aumento en la tasa de secreción inducida por hipoxia en soluciones control y en presencia de DMSuc en 10 experimentos independientes. (C) La tasa de secreción promedio durante la hipoxia de células glómicas en solución control y tratadas con DMSuc (control: 2429 ± 784 fC/min en 12/7 registros/cultivos y DMSuc: 4759 ± 1046 fC/min en 12/7 registros/cultivos). Los datos representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$.

	Parche perforado	
	CONTROL	SUCCINATO
Resistencia de entrada (GOhm)	$2,42 \pm 0,28(5)$	$3,25 \pm 0,39(11)$
Potencial de reversión (mV)	$-32,54 \pm 3,95(5)$	$-32,36 \pm 1,60(11)$
Corriente de inyección a -70mV (pA)	$-24,20 \pm 3,38(5)$	$-19,73 \pm 1,68(11)$

Tabla 6. Propiedades electrofisiológicas de las células glómicas controles y las células dializadas con succinato. Los datos se presentan como los valores medios \pm error estándar; el número de células registradas se muestran entre paréntesis.

Los resultados descritos en este primer apartado de la Tesis confirman que la pérdida selectiva a nivel sistémico y celular de la respuesta a hipoxia en los ratones ESR-NDUFS2 depende de la pérdida de actividad del CMI, ya que ocurre en paralelo a la pérdida de actividad del CMI tras el tratamiento con TMX. Además, apoyan la importancia de las moléculas NADH y ROS como moléculas señalizadoras de la respuesta a hipoxia en las

células glómicas. Finalmente, los experimentos basados en la modulación de la actividad del CMII, y por tanto la producción de quinona reducida, confirman la importancia del ratio CoQH₂/CoQ en la capacidad de responder a hipoxia de las células glómicas del CC (ver más detalles en “Discusión”).

2. Papel de receptor olfatorio atípico Olfr78 en la respuesta aguda a la hipoxia de los quimiorreceptores arteriales

En paralelo a nuestra propuesta, donde sugerimos que el CMI es necesario para la respuesta ante una disminución de oxígeno en las células glómicas (Fernández-Agüera *et al.*, 2015), se publicó un artículo donde se propuso que el receptor olfatorio Olfr78, un receptor atípico altamente expresado en el CC, es esencial para detectar la hipoxia aguda en las células glómicas (Chang *et al.*, 2015). Estos autores sugieren que los cambios en los niveles de oxígeno en sangre no son detectados directamente por las células glómicas, sino indirectamente a través de un metabolito, el lactato, cuya producción está regulada por la disponibilidad de oxígeno. Chang y colaboradores proponen que durante la hipoxia hay un incremento de lactato en sangre que estimula al receptor Olfr78 de la membrana plasmática de las células glómicas desencadenando la liberación de neurotransmisores y la respuesta sistémica a hipoxia aguda. Estos autores han descrito que la eliminación de la expresión del gen *Olfr78*, da lugar a animales que no presentan respuesta hiperventilatoria a hipoxia (Chang *et al.*, 2015); (ver “Introducción”). Para corroborar la hipótesis, que contrasta frontalmente con nuestra propuesta descrita en el apartado primero de la Tesis, se puso en marcha un proyecto de colaboración multinacional en el que se estudió la respuesta a hipoxia, sistémica y celular, en el modelo de animal *knockout* para el *Olfr78*.

2.1. Estudio de los ratones Olfr78. Tratamiento y evolución de la línea

El estudio sobre el papel del receptor Olfr78 en los quimiorreceptores arteriales del CC se ha llevado a cabo en dos modelos de animales disponibles donde el gen *Olfr78* estaba mutado: ratones "FRA" y ratones "JAX". Ambas cepas fueron expandidas en Sevilla a partir de parentales heterocigotos (+/-) de diferente procedencia: los ratones FRA, fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Peter Mombaerts en Frankfurt, pero habían sido expandidos previamente en su laboratorio. Por el contrario, los ratones JAX, fueron expandidos en Sevilla directamente a partir de heterocigotos que procedían directamente de “*The Jackson Laboratory*” (ver “Métodos”). Estas cepas no coincidieron cronológicamente (primero estudiamos la cepa FRA y luego la JAX), ni fueron estabuladas en el mismo animalario; de

esta forma evitamos la interacción y posibles cruces entre ambas cepas.

2.2. Validación del modelo *Olf78*

Para corroborar que el receptor atípico *Olf78* estaba mutado en nuestros modelos de ratones se utilizaron distintas técnicas. En primer lugar, se llevó a cabo el genotipado de los ratones de ambas líneas (FRA y JAX), utilizando la técnica de PCR convencional con el protocolo apropiado explicado en el apartado de metodología (ver “Métodos”). Con esta técnica se comprobó si los ratones no estaban modificados genéticamente (ratones controles, +/+) o si el plásmido de sustitución, compuesto por una secuencia que codifica para GFP-IRES-TauLacZ (Figura 43 A), estaba presente en un alelo (animales heterocigotos, +/-) o en los dos alelos (animales *knockout*, -/-) del gen *Olf78* (Figura 43 B).

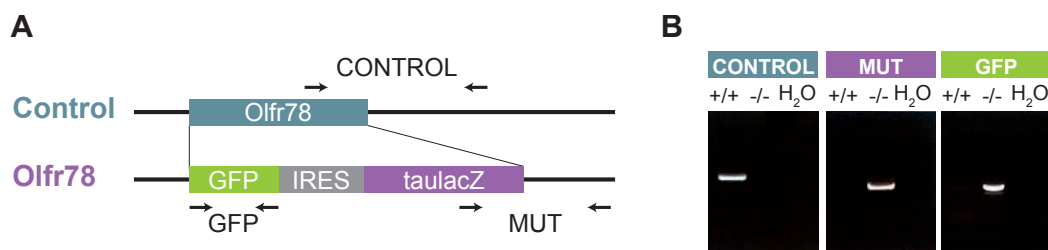


Figura 43. Genotipo de los modelos animales *Olf78* (FRA y JAX). (A) Esquema de los dos tipos de alelos: control (verde) y plásmido de sustitución de *Olf78* (morado). *Olf78*: región que codifica para *Olf78* sin modificación; GFP: proteína fluorescente verde; IRES: sitio interno de entrada al ribosoma; taulacZ: fusión de tau bovino con β -galactosidasa. Las flechas indican la posición y orientación de los cebadores de PCR utilizados para el genotipado. (B) Genotipado del ADN genómico de los dedos de ratones controles (+/+) y homocigotos (-/-) por PCR. El par de cebadores de PCR "CONTROL" amplifica el alelo de *Olf78* no modificado; el par de cebadores de PCR "GFP" amplifica las secuencias internas de GFP; y el par de cebadores de PCR "MUT" amplifica el alelo *Olf78* mutado.

Posteriormente, con la técnica de PCR cuantitativa (PCRq) (ver “Métodos”), se comparó los niveles de expresión del ARNm del gen *Olf78* en CC, CGS y MA entre los ratones controles y los ratones mutantes *Olf78*-FRA. Como era esperable, el nivel de ARNm de *Olf78* descendió significativamente en el CC, el GCS y la MA de los ratones *knockout* para el *Olf78* (-/-) frente a los ratones controles (+/+) (Figura 44).

Gracias a que en los animales *knockout* para el gen *Olf78* parte de la región codificante ha sido sustituida por el fragmento GFP-Ires-tauLacZ, es posible detectar la expresión de la proteína fluorescente verde en los tejidos de animales *knockout* para el *Olf78* que expresan el receptor *Olf78* (Figura 43). La expresión de la proteína GFP en animales

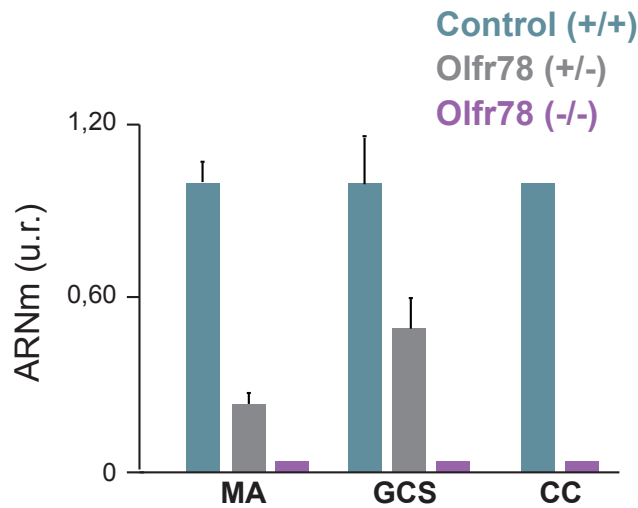


Figura 44. Ausencia de ARNm *Olfr78* en los ratones *knockout* *Olfr78*-FRA. Cantidad relativa de ARNm *Olfr78*, comparado con el *housekeeping* *Gapdh*, en médula adrenal (MA), ganglio cervical superior (GCS) y cuerpo carotídeo (CC) de ratones controles (verde), heterocigotos (gris) y *knockout* (morado). N= 3-5/grupo. u.r. unidades relativas. Los datos representan la media \pm SEM.

Olfr78^{-/-} fue utilizado para corroborar el genotipo de las rodajas registradas con amperometría. Se realizaron estudios inmunohistológico usando anticuerpos contra la GFP y contra la tiroxina hidroxilasa (TH) (ver “Métodos”). Los resultados corroboraron el genotipo de los ratones *Olfr78* (-/-) que mostraron una fluorescencia de GFP en células TH+ del CC (Figura 45, paneles inferiores) a diferencia de las rodajas de ratones controles (Figura 45, paneles superiores).

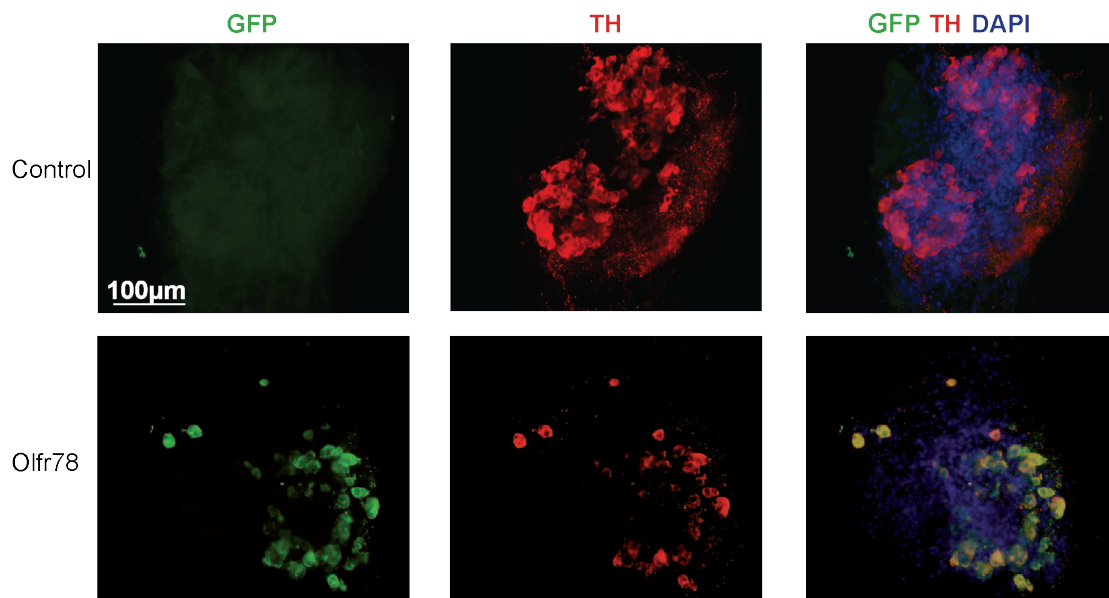


Figura 45. Detección inmunohistoquímica de proteína fluorescente verde (GFP) y tiroxina hidroxilasa (TH) en rodajas de cuerpo carotídeo. Las tres imágenes superiores (GFP, TH y GFP/TH/DAPI, respectivamente) corresponde con rodajas de CC de ratones controles y las tres inferiores con rodajas de ratones *knockout* para *Olfr78*. Nótese que los ratones *knockout* para *Olfr78* son GFP+ y que esta proteína se expresa en células TH+.

2.3. Respuestas a hipoxia en ratones *Olf78*

Tras comprobar que el receptor atípico *Olf78* estaba altamente expresado en CC y que disponíamos de un modelo de ratón donde el gen *Olf78* estaba mutado, procedimos a realizar los distintos experimentos, tanto a nivel sistémico como a nivel celular, para analizar la respuesta de estos animales ante una disminución aguda de la tensión de oxígeno.

2.3.1. Respuesta ventilatoria a hipoxia aguda

En primer lugar, siguiendo el mismo protocolo que en el modelo ESR-NDUFS2, se estudió el efecto de la mutación de *Olf78* sobre la respuesta ventilatoria aguda a hipoxia (RVH) y a hipercapnia. Para ello, parejas de ratones controles y ratones *knockout* para *Olf78* (de la cepa FRA o de JAX) de la misma camada se sometieron a pletismografía. Con esta técnica analizamos la frecuencia respiratoria en condiciones de normoxia y su incremento ante hipoxia (10% O₂ durante 5 minutos) e hipercapnia (4-5% CO₂ durante un minuto) (ver “Métodos”). Tanto los ratones controles como los dos modelos de ratones *knockout* para *Olf78* mostraron un incremento reversible y significativo del número de respiraciones por minuto en respuesta a hipoxia e hipercapnia (Figura 46; Figuras 47 y 48).

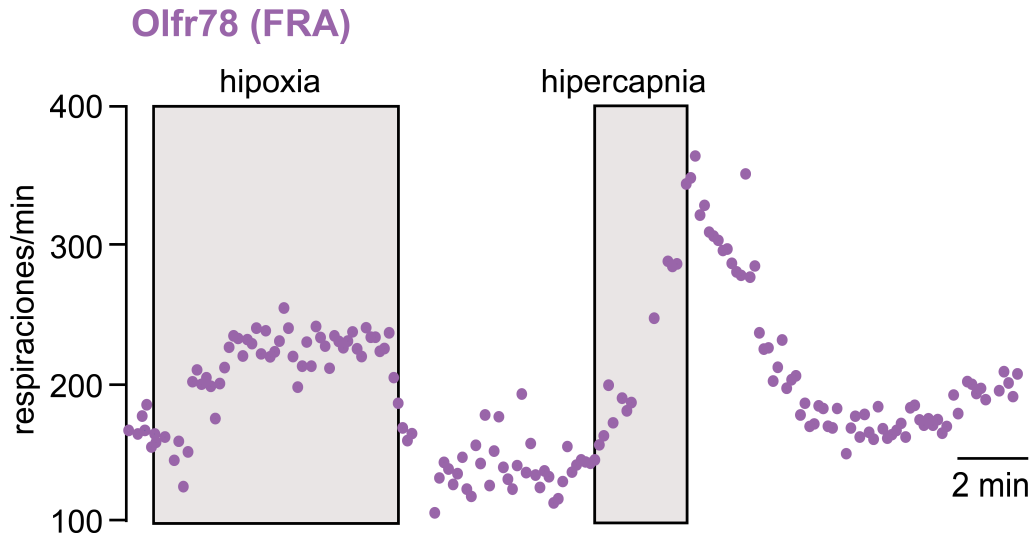


Figura 46. Respuesta ventilatoria a hipoxia e hipercapnia de ratones controles y deficientes para *Olf78* (FRA). Registros pletismográficos representativos de los cambios en frecuencia respiratoria de ratones controles (A) y *Olf78*-FRA (B) en respuesta a hipoxia y a hipercapnia. El tiempo de exposición de hipoxia e hipercapnia se muestra con un cuadrado gris.

Además, comparamos la cinética del incremento de la frecuencia respiratoria y la amplitud de la respuesta ventilatoria a hipoxia y a hipercapnia entre animales controles y deficientes para *Olf78* (FRA). Las cuantificaciones de los registros mostraron que no había

diferencia significativa en la respuesta respiratoria a hipoxia e hipercapnia entre los ratones *knockout* para *Olf78* y los ratones controles de la misma camada (Figura 47).

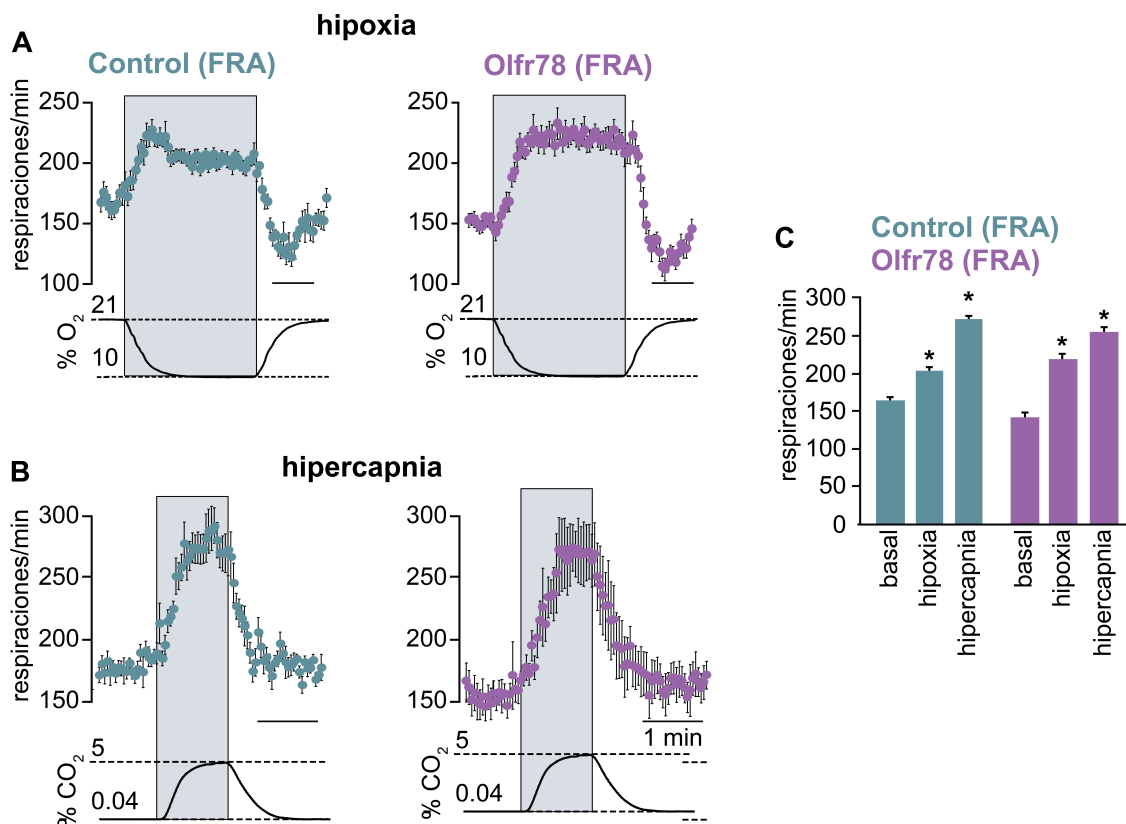


Figura 47. Análisis de la respuesta ventilatoria de ratones controles y Olf78 FRA. (A-B) Registros pleiomográficos (frecuencia respiratoria medida respecto al tiempo) de la respuesta respiratoria a hipoxia (A) e hipercapnia (B) realizados en ratones controles (verde, n = 10) y Olf78-FRA (morado, n = 10). Cada punto de dato corresponde con la frecuencia respiratoria de ese punto temporal y se representa como la media de los diez ratones \pm SEM. Las tensiones de oxígeno (% O₂) y dióxido de carbono (% CO₂) están indicadas en la parte inferior de las Figuras. (C) Media de la frecuencia respiratoria durante control, hipoxia e hipercapnia en 10 ratones controles (164 \pm 6 resp/min; 203 \pm 4 resp/min y 271 \pm 14 resp/min, respectivamente) en comparación con sus compañeros de camada Olf78 FRA (147 \pm 5 resp/min; 219 \pm 7,5 resp/min y 254 \pm 12 resp/min, respectivamente). Los datos se dan como media \pm SEM. * p < 0,001. resp: respiraciones

Estos resultados demuestran que el receptor Olf78, no es necesario para desencadenar la respuesta ventilatoria a hipoxia, lo que contrasta notablemente con los resultados publicados por Chang *et al.*, (2015), quienes han descrito una abolición completa de la respuesta ventilatoria a la hipoxia en ratones *knockout* para *Olf78*. Para descartar que posibles cambios en el fondo genético de la cepa de ratones "FRA", como consecuencia de su estabulación y expansión en Frankfurt pudieran haber alterado sus respuestas fisiológicas a la hipoxia, se utilizó una nueva cepa de animales recién generados por los laboratorios Jackson y enviados directamente a Sevilla. En esta nueva cepa, "JAX" repetimos los experimentos y

Resultados

observamos que sus frecuencias respiratorias basales eran similares a las registrada anteriormente en el modelo FRA. Además, los ratones deficientes para *Olf78* (JAX) presentaban una clara respuesta a hipoxia y a hipercapnia no diferenciable de la de los ratones controles de su camada. El análisis comparativo de la cinética y la amplitud de la respuesta a hipoxia e hipercapnia de los ratones *Olf78* (JAX) se ilustra en la Figura 48. Como se puede comprobar no se observaron diferencias significativas entre los animales control y los animales *knockout* para *Olf78* de la misma camada procedentes directamente del laboratorio Jackson.

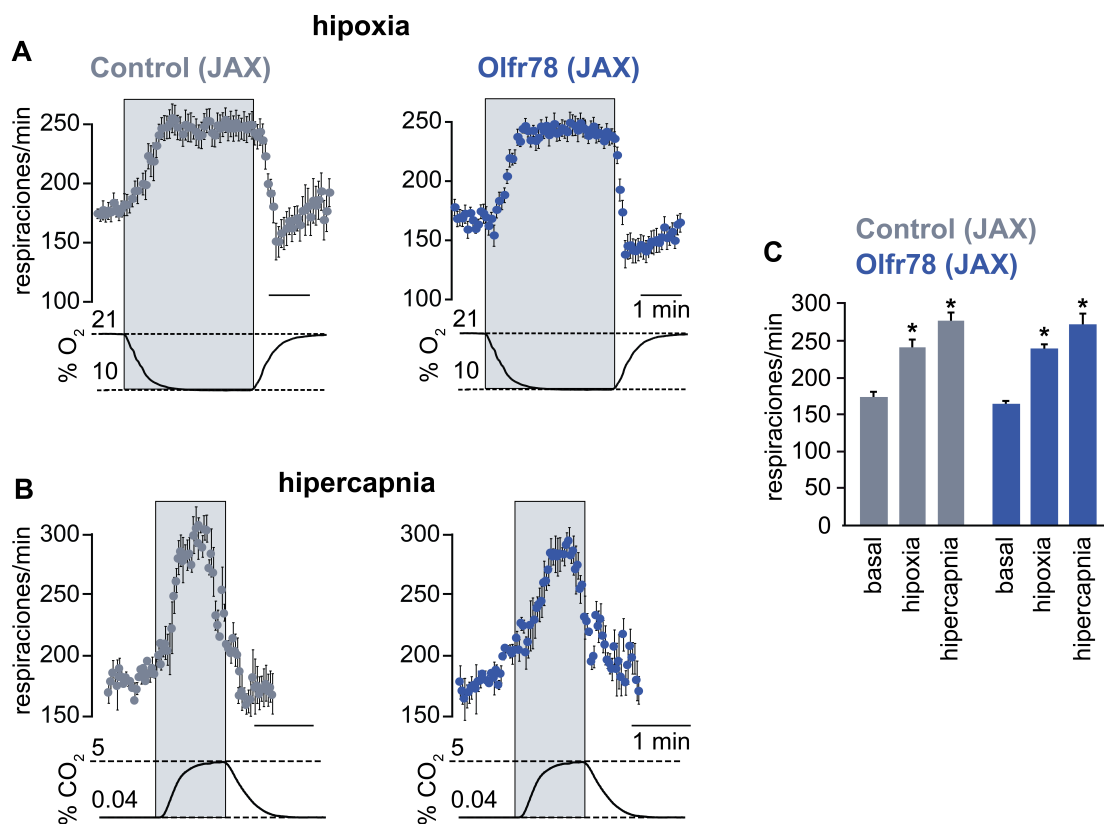


Figura 48. Análisis de la respuesta ventilatoria de ratones controles y *Olf78* JAX. (A-B) Registros pleto-mográficos (frecuencia respiratoria medida respecto al tiempo) de la respuesta respiratoria a hipoxia (A) e hipercapnia (B) realizados en ratones controles (gris, n= 10 para hipoxia y n= 7 para hipercapnia) y de ratones *Olf78*-JAX (azul, n = 10 para hipoxia y n = 7 para hipercapnia). (C) Media de la frecuencia respiratoria durante control, hipoxia e hipercapnia en ratones controles ($174 \pm 9,5$ resp/min; 239 ± 10 resp/min y 276 ± 13 resp/min, respectivamente) en comparación con sus compañeros de camada *Olf78* JAX (165 ± 4 resp/min; $239 \pm 5,5$ resp/min y 273 ± 16 resp/min, respectivamente). Los datos se dan como media \pm SEM. * p <0,001. resp: respiraciones.

Con estos resultados podemos concluir que el receptor *Olf78* no es necesario para activar la respuesta respiratoria adaptativa a la hipoxia aguda en el animal completo.

2.3.2. Respuesta a hipoxia en las células glómicas de ratones *Olf78*

Con objeto de comprobar si el CC de los ratones *knockout* para *Olf78* era capaz de responder a hipoxia, se llevaron a cabo experimentos registrando la actividad secretora de las células glómicas en rodajas de CC y el incremento de calcio citosólico en células glómicas dispersas.

2.3.2.1. Respuesta secretora a hipoxia en rodajas de cuerpo carotideo

La respuesta neurosecretora a hipoxia fue registrada con amperometría en rodaja de CC (ver “Métodos”). Los experimentos se llevaron a cabo cuando los ratones tenían dos meses de edad, tras comprobar con pletismografía que respondían con un aumento de la frecuencia respiratoria a hipoxia aguda (Figura 47 y 48). Los resultados mostraron que tanto las rodajas de CC de ratones controles como las de los ratones *Olf78* (FRA y JAX *Olf78*^{-/-}) respondían con un aumento en la secreción de dopamina cuando fueron expuestas a hipoxia, hipercapnia y a potasio (Figura 49 A-C) y que no hubo diferencias significativas entre la tasa de secreción de los diferentes grupos ante los distintos estímulos (Figura 49 D).

2.3.2.2. Cambios en la concentración de calcio intracelular en respuesta a la hipoxia

Para comprobar la activación de las células glómicas deficientes en *Olf78*, se estudió también el incremento de calcio citosólico en respuesta a hipoxia aguda característico de células glómicas controles. Los resultados mostraron que tanto las células glómicas de ratones controles (Figura 50 A) como las de ratones *knockout* para *Olf78* (Figura 50 B) respondieron con un incremento de calcio intracelular en respuesta a hipoxia aguda. Incluso siendo menor el incremento de calcio durante alto potasio en células *knockout* para *Olf78*, la capacidad para responder a hipoxia no se vio afectada (Figura 50 C). Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que el receptor *Olf78* no es necesario para activar la respuesta sistémica ni celular a hipoxia aguda mediada por el CC (ver “Discusión”).

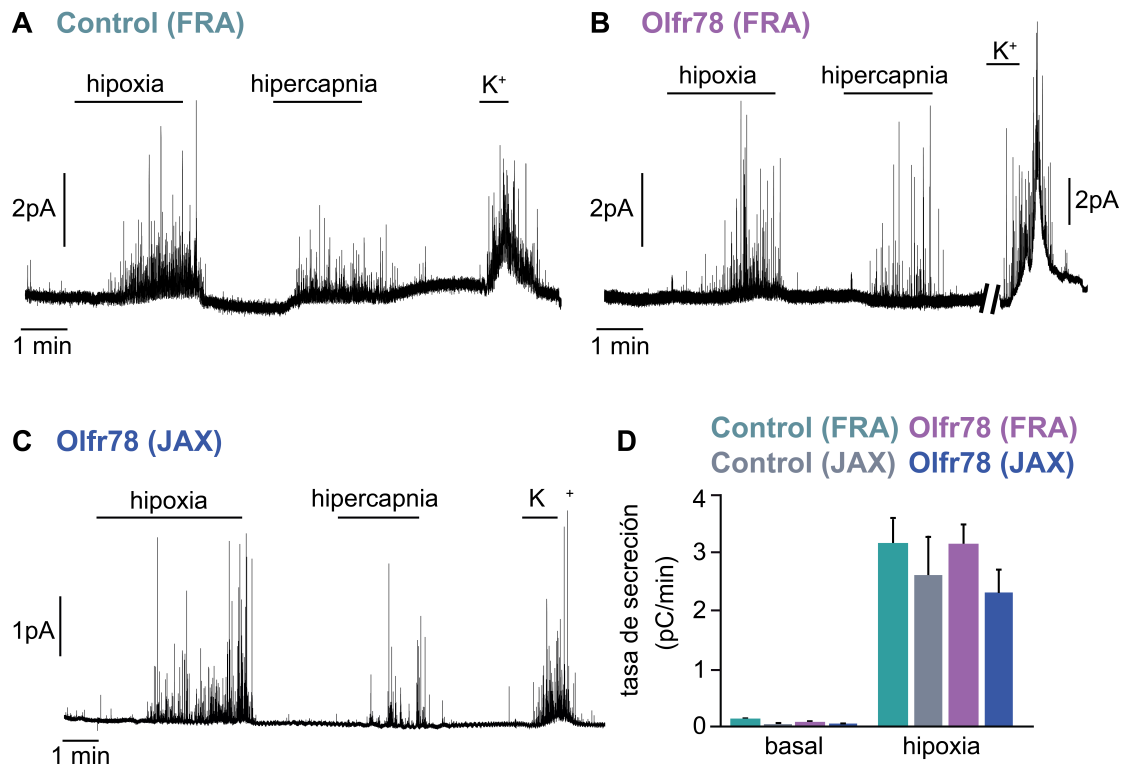


Figura 49. Respuestas secretoras a hipoxia en rodaja de CC de ratones Olfcr78. (A-C) Registros amperométricos representativos en células de ratones controles FRA (A, verde), Olfcr78 FRA (B, morado) y Olfcr78 JAX (C, azul). (D) Cuantificación de la tasa la secreción en rodajas de CC controles y Olfcr78 (FRA y JAX) en estado basal (Control FRA: 94 ± 31 fC/min en 9 ratones; Olfcr78 FRA: 23 ± 7 fC/min en 7 ratones; Control JAX: 50 ± 26 fC/min en 7 ratones; y Olfcr78 JAX: 67 ± 31 fC/min en 6 ratones) y en hipoxia (Control FRA: 3269 ± 444 fC/min en 9 ratones; Olfcr78 FRA: 3279 ± 352 fC/min en 7 ratones; Control JAX: 2652 ± 713 fC/min en 7 ratones; y Olfcr78 JAX: 2373 ± 423 fC/min en 6 ratones). Nótese que no hay diferencia significativa comparando la tasa de secreción de los 4 grupos entre sí en cada condición. Los datos se dan como media \pm SEM.

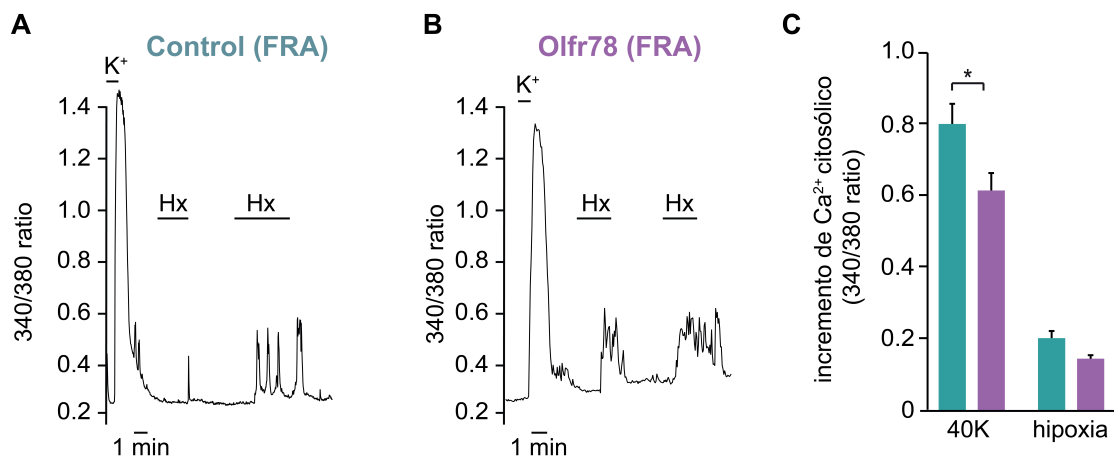


Figura 50. Aumento Ca²⁺ intracelular en ratones controles y Olfcr78 en respuesta a hipoxia. (A-B) Registros representativos de los cambios en la $[Ca^{2+}]_{in}$ en células controles (A, verde) y Olfcr78 (B, morado). (C) Cuantificación del incremento de calcio en células controles (verde) y *knockout Olfcr78* (morado) inducido por alto K⁺ e hipoxia. (controles: K⁺: $0,81 \pm 0,07$ u.a. en 27/5 células/ratones e hipoxia: $0,20 \pm 0,02$ u.a. en 17/5 células/ratones y *Olfcr78-KO*: K⁺: $0,63 \pm 0,06$ u.a. en 32/5 células/ratones; hipoxia: $0,16 \pm 0,01$ u.a. en 25/5 células/ratones). Los datos se dan como media \pm SEM. * $p < 0,05$ u.a. unidades arbitrarias.

2.4. Respuesta a lactato en las células glómicas del cuerpo carotídeo de ratones Olf78

En el modelo propuesto, Chang *et al.* (2015) sugieren que la hipoxia induce un incremento de lactato tanto a nivel de CC como a nivel sistémico y que este lactato activa a las células glómicas de forma endocrina y paracrina a través de su unión con el receptor Olf78, desencadenando un incremento de calcio intracelular y la secreción de neurotransmisores. Este modelo está basado en experimentos *in vitro* usando CC completos y midiendo la actividad eléctrica del nervio de seno carotídeo, donde la estimulación del CC con 30 mM lactato produce un incremento en la actividad eléctrica del nervio del seno que desaparece en los ratones *knockout* para Olf78 (ver “Introducción”); (ver Chang *et al.*, 2015).

Con el fin de comprobar si el lactato provocaba una activación a nivel de CC, y si esta estaba mediada por el receptor olfatorio Olf78, se realizaron experimentos en rodajas de CC y en células glómicas aisladas de ratones controles y *knockout* para Olf78.

2.4.1. Respuesta secretora a lactato en rodajas de cuerpo carotídeo

La respuesta neurosecretora a un incremento de lactato se registró con amperometría en rodaja de CC (ver “Métodos”) de animales adultos control y *knockout* para Olf78. Los resultados mostraron que tanto las rodajas de CC de ratones controles como las de los ratones Olf78 respondían con aumento de secreción de dopamina cuando fueron expuestas a lactato (Figura 51).

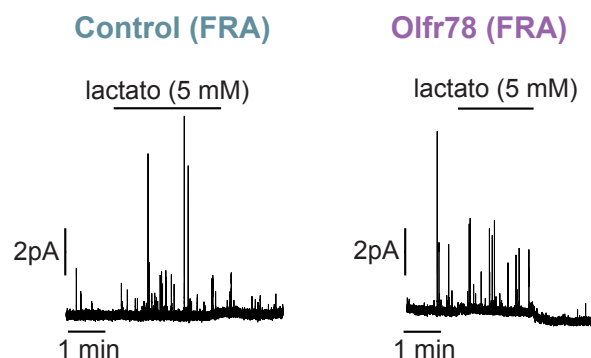


Figura 51. Respuesta secretora de las células glómicas de ratones controles y Olf78 (FRA) a 5 mM lactato. Registros amperométricos representativos de rodajas de CC de ratones controles FRA (A, verde) y Olf78 FRA (B, morado). Nótese que ambos muestran un incremento de respuesta secretora similar.

2.4.2. Incremento de calcio intracelular en respuesta a lactato en células glómicas de ratones Olf78

Posteriormente, se midió el incremento de calcio intracelular en respuesta a lactato y

los resultados mostraron que tanto en las células glómicas de ratones controles (Figura 52 A) como las células de los ratones *knockout* para *Olf78* (FRA) (Figura 52 B) se incrementaba el calcio intracelular en respuesta a lactato con una respuesta de amplitud similar (Figura 52 C).

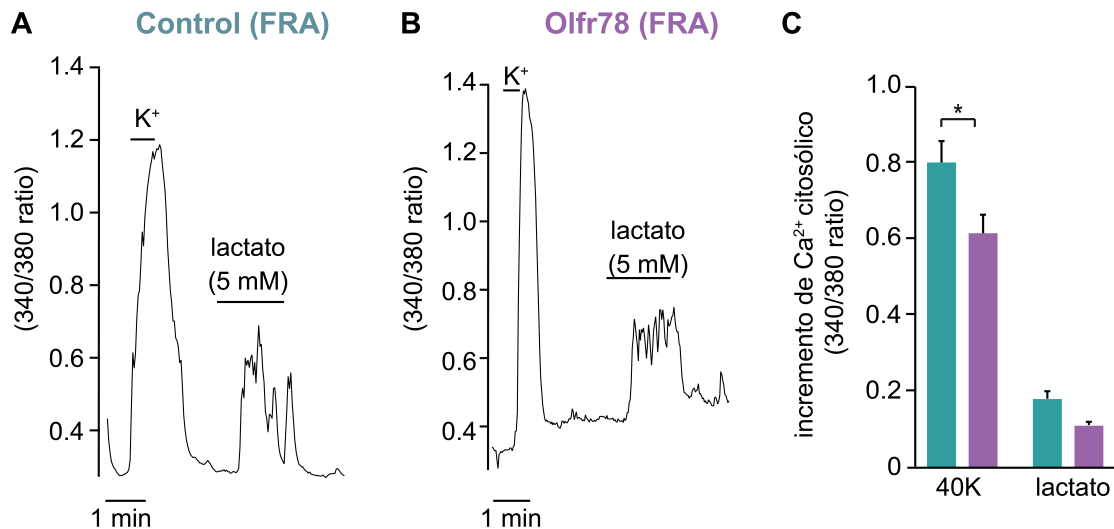


Figura 52. Aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular de las células glómicas de ratones controles y *Olf78* en respuesta a 5 mM lactato. (A-B) Registros representativos de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ en células controles (A, verde) y *Olf78* (B, morado). (C) Cuantificación del incremento de calcio en células controles (verde) y *knockout* para *Olf78* (morado) inducido por alto K^+ y lactato. (controles: K^+ : $0,81 \pm 0,07$ u.a. en 27/5 células/ratones y lactato: $0,18 \pm 0,02$ u.a. en 15/5 células/ratones. *Olf78-KO*: K^+ : $0,63 \pm 0,06$ u.a. en 32/5 células/ratones; lactato: $0,12 \pm 0,01$ u.a. en 14/5 células/ratones). * $p < 0,05$ comparado con control. u.a. unidades arbitrarias. Los datos se dan como media \pm SEM.

Por lo tanto, nuestros resultados muestran que las células glómicas se activan por concentraciones fisiológicas de lactato (ver más adelante). Sin embargo, nuestros datos no corroboran que el efecto del lactato esté mediado por el receptor olfatorio *Olf78*, dado que animales con ablación del gen *Olf78* responden a lactato igual que los animales control.

3. Estimulación de las células glómicas por lactato

Los parámetros respiratorios varían como un mecanismo de adaptación ante distintos estímulos. El ejercicio y la hipoxia son circunstancias que activan una respuesta hiperventilatoria y en ambos casos hay un incremento de la concentración de lactato en sangre; sin embargo, la PaO_2 es distinta: durante hipoxia hay una disminución de la PaO_2 y en el ejercicio moderado no hay cambios significativos de la PaO_2 si se realiza a nivel del mar. Se desconoce cuál es la función biológica del incremento de lactato en ambas condiciones y cual es su contribución a la respuesta hiperventilatoria adaptativa (Lee *et al.*, 1996; Fregosi, 1998; Hardarson *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2015; San-Millan y Brooks, 2018). En este tercer

apartado de “Resultados” se estudia si el lactato es capaz de activar el CC y su efecto sobre la respuesta a hipoxia en las células glómicas.

3.1. Incremento de la concentración de lactato en sangre en respuesta a hipoxia aguda

Los niveles de lactato en sangre se incrementan rápidamente durante hipoxia, llegando incluso a duplicarse en algunos tejidos en tan solo 30 segundos (Kirsch *et al.*, 1983) (ver “Introducción”). Para determinar en nuestro modelo experimental la dependencia del incremento de lactato en sangre con la disminución de PO₂ medimos la concentración de dicho metabolito, en ratones controles, tras ser expuestos a un ambiente con distintas PO₂ (ver “Métodos”); (ver diseño experimental en Figura 53 A). Los resultados obtenidos confirmaron el incremento de lactato en sangre durante la hipoxia, llegando incluso a duplicar su concentración durante la exposición de los ratones a una hipoxia severa (10% O₂) (Figura 53 B).

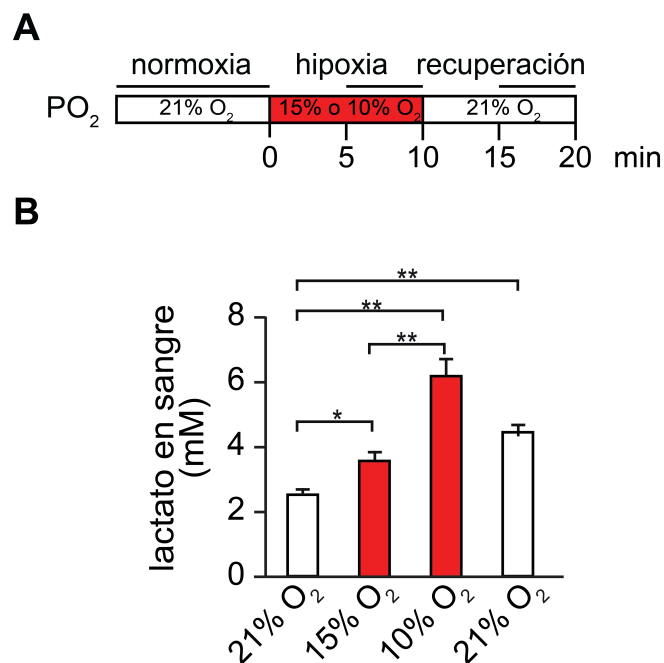


Figura 53. Niveles de lactato en sangre en función de la presión parcial de oxígeno en el aire inspirado. A) Diseño experimental para medir la concentración de lactato en sangre en las condiciones de normoxia, hipoxia (15% y 10% de PO₂, rojo) y tras la recuperación en normoxia. El porcentaje de O₂ aparece dentro de las cajas. Las líneas horizontales indican los momentos de medida de lactato en cada condición. Gráfico duplicado del apartado de Métodos. (B) Medida del incremento de la concentración de lactato en respuesta a distintos niveles de hipoxia en ratones controles (normoxia 2,47 ± 0,15 mmol/L en 29 ratones; hipoxia leve (15% de O₂) 3,57 ± 0,32 mmol/L en 17 ratones; hipoxia severa (10% de O₂) 6,16 ± 0,59 mmol/L en 24 ratones y recuperación 4,36 ± 0,31 mmol/L en 14 ratones) * p < 0,05; ** p < 0,001. Los datos representan la media ± SEM.

3.2. Activación de las células glómicas por lactato

Para estudiar si el incremento de lactato *per se*, es decir, sin modificación del pH y la PO_2 , activa a las células quimiosensitivas del CC se llevaron a cabo registros utilizando las técnicas de medida de secreción dopaminérgica (amperometría) y de calcio citoplasmático (microfluorimetría) (ver “Métodos”). Las concentraciones de L-Lactato sódico utilizadas fueron 5 y 10 mM, que es el valor fisiológico que se alcanza durante la exposición a hipoxia (Figura 53 B). Los registros mostraron que las rodajas de CC son capaces de responder ante un incremento de lactato extracelular aumentando la tasa de secreción (Figura 54 A).

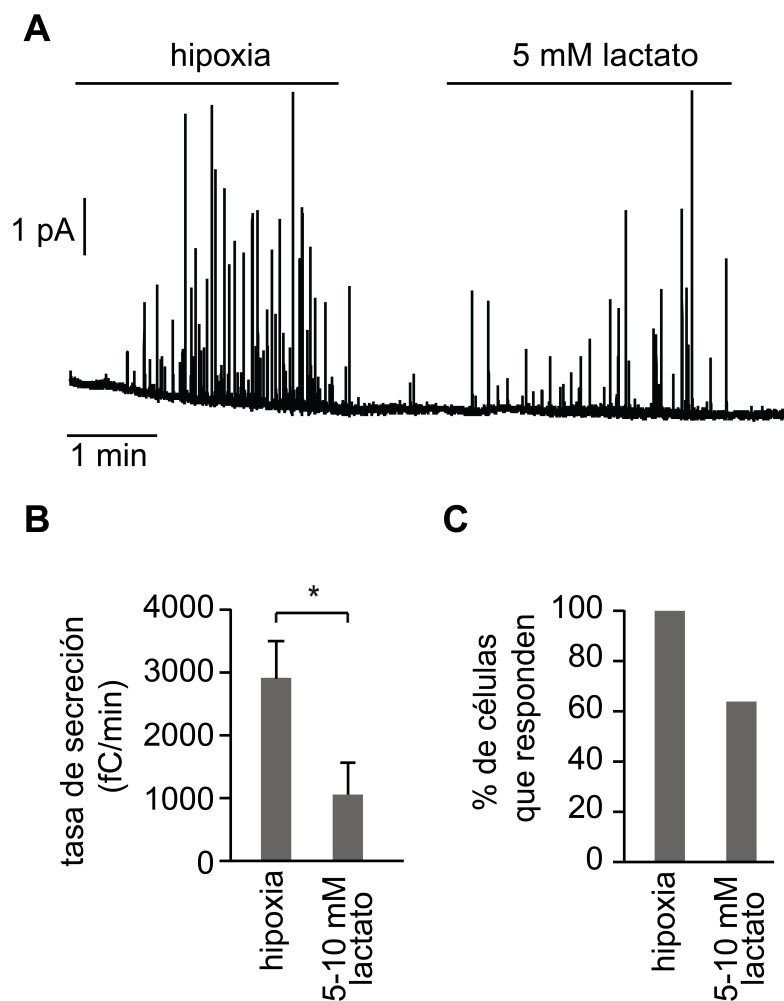


Figura 54. Las células del cuerpo carotídeo (registradas en rodajas de tejido) son activadas por un incremento de lactato extracelular. (A) Registro amperométrico representativo de la respuesta secretora durante hipoxia y alto lactato. (B) Cuantificación de la tasa de secreción inducida por hipoxia y por 5-10 mM lactato (hipoxia, 2926 ± 599 fC/min y 5-10 mM lactato, 1060 ± 551 fC/min de 17/15 registros/cultivos). (C) Porcentaje de células que respondieron con un incremento en secreción de dopamina a hipoxia y lactato, normalizadas al número total de células que respondieron a hipoxia (del 100% de los registros que respondieron a hipoxia solo el 65% de las células respondieron a 5-10 mM lactato). * $p < 0.05$. Los datos representan la media \pm SEM.

Resultados

La respuesta secretora inducida por lactato es significativamente menor que la inducida por la hipoxia (Figura 54 B). Solo el 65% de las células que respondieron a hipoxia fueron capaces de responder a lactato (Figura 54 C), sugiriendo que el CC es más sensible a hipoxia que a lactato (ver “Discusión”). La activación de las células glómicas por lactato es dosis-dependiente ya que la tasa de secreción aumenta gradualmente con el incremento de la concentración de lactato (Figura 55 A y B).

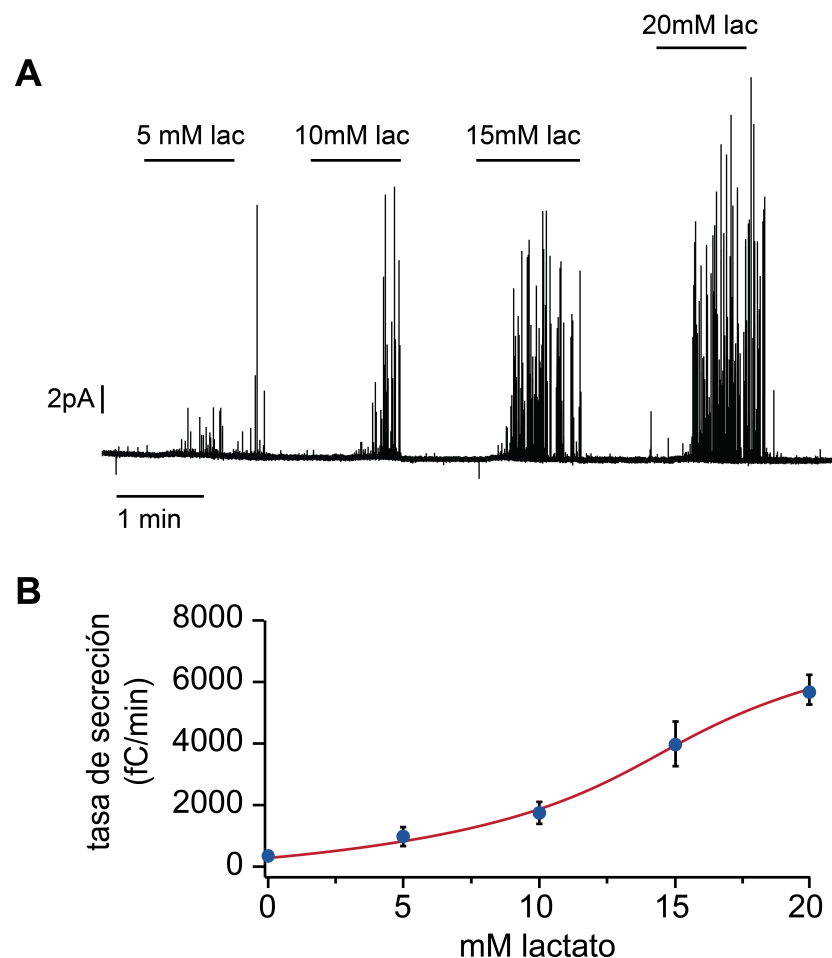
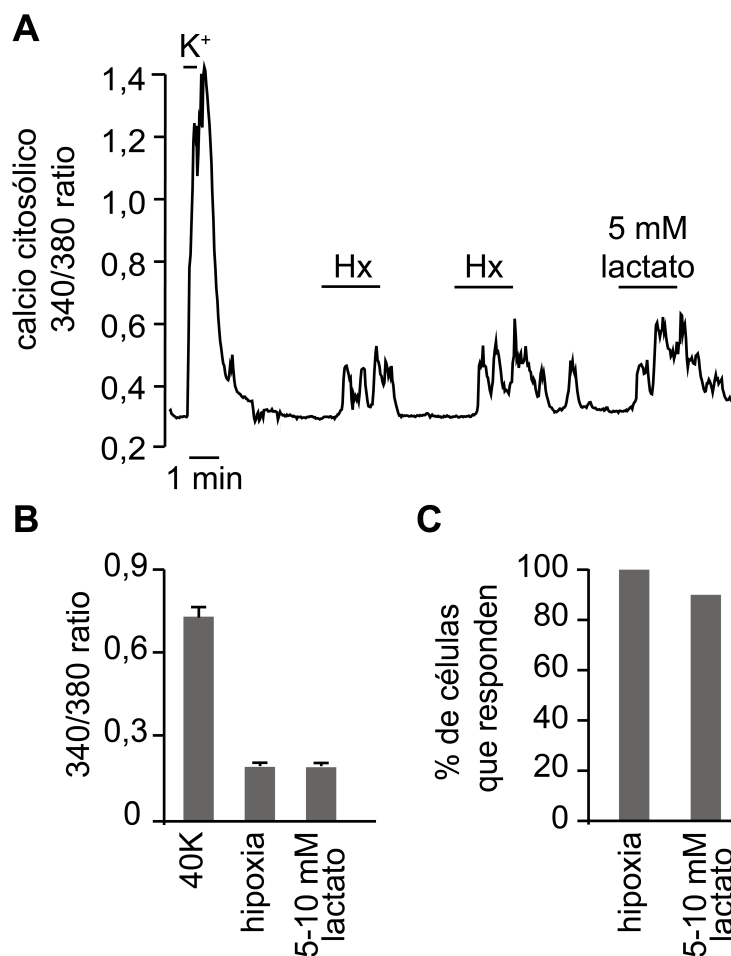


Figura 55. Respuesta secretora inducida por distintas concentraciones de lactato extracelular de células glómicas en rodajas de cuerpo carotídeo. (A) Registro amperométrico representativo de la tasa de secreción inducida por diferentes concentraciones de lactato extracelular. (B) Cuantificación de la tasa de secreción inducida por distintas concentraciones de lactato (Basal (0 mM lactato): $76 \pm 0,6$ fC/min; 5 mM lactato: 935 ± 389 fC/min; 10 mM lactato: 1775 ± 713 fC/min; 15 mM lactato: 4048 ± 1460 fC/min; 20 mM lactato: 5656 ± 1009 fC/min en 8/7 registros/cultivos). La línea de ajuste (rojo) está trazada a ojo. Los datos representan la media \pm SEM.

Como se describió en la “Introducción”, la respuesta secretora inducida por la hipoxia en las células glómicas del CC es dependiente del incremento de calcio citosólico proveniente del espacio extracelular (Fishman *et al.*, 1985; Ureña *et al.*, 1994). Estudiamos si la activación

Resultados

de las células glómicas por lactato es también dependiente de un incremento de calcio citosólico y si este calcio proviene del medio extracelular o de almacenes intracelulares. Para ello, registramos con microfluorimetría (ver “Métodos”) la respuesta de las células glómicas aisladas a lactato e hipoxia. Los resultados obtenidos mostraron que hubo incremento de calcio citosólico en ambas condiciones, lactato e hipoxia, (Figura 56 A), y que no había diferencias en la amplitud de la respuesta, ni en el número de células capaces de responder a ambos estímulos (Figura 56 B y C), a diferencia de los resultados obtenidos en registros de rodajas de CC (ver “Discusión”).



Resultados

La utilización de cadmio, bloqueante de canales de calcio dependientes de voltaje (Ureña *et al.*, 1994), fue capaz de abolir tanto la respuesta secretora (Figura 57 A) como el incremento de calcio inducido por lactato extracelular (Figura 57 B). En base a estos resultados podemos concluir que las células glómicas del CC se activan por lactato, mediante la entrada de calcio extracelular, que incrementa el calcio citosólico y promueve la liberación de vesículas secretoras.

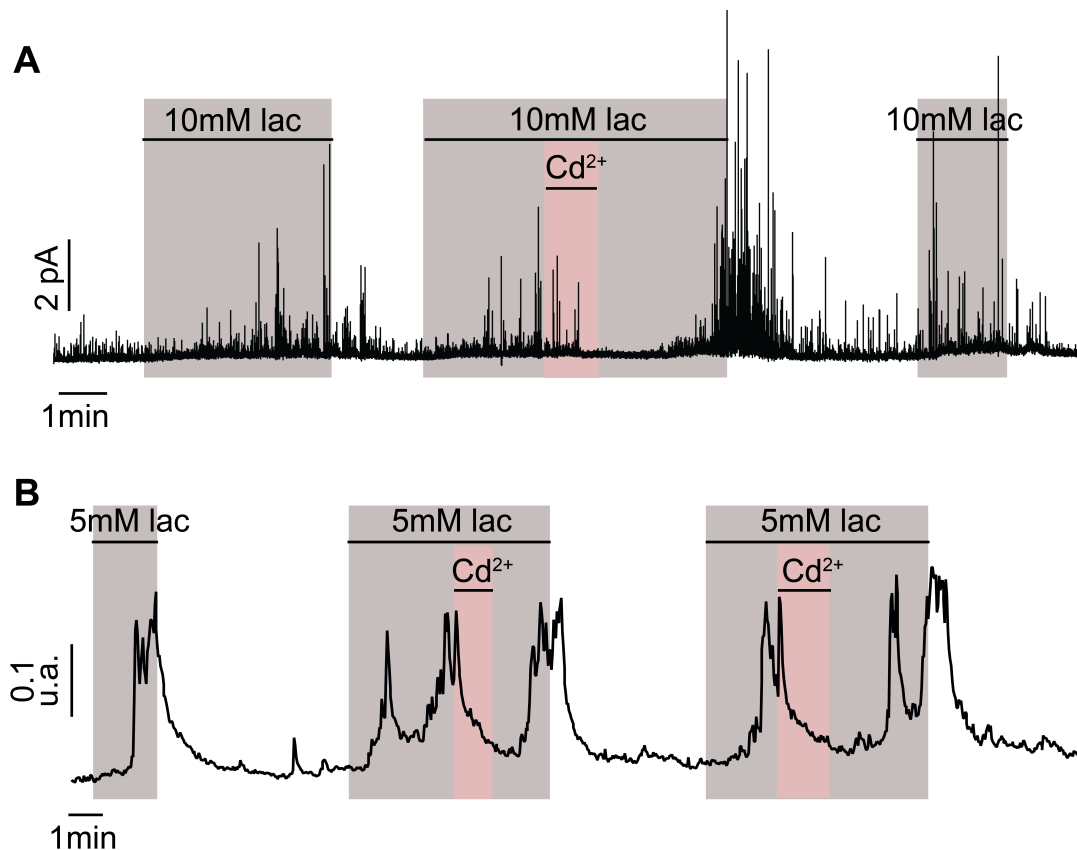


Figura 57. Dependencia de calcio extracelular para la activación por lactato de las células glómicas. (A-B) Registros representativo de la abolición del incremento producido por lactato de la respuesta secretora (A) y del incremento de calcio citosólico cuando se aplica 0,2 mM cadmio extracelular (B). u.a. unidades arbitrarias.

3.2.1. Efectos del lactato sobre el potencial de membrana y las corrientes de potasio de las células glómicas

La activación de las células glómicas por hipoxia depende de una despolarización del potencial de membrana que abre los canales de calcio dependientes de voltaje. Estudiamos si en respuesta a lactato hay una despolarización previa a la entrada de calcio extracelular. Para ello usamos la técnica de *patch clamp* en la configuración parche perforado en *current-clamp* (ver “Métodos”). Los resultados mostraron una despolarización reversible del potencial de membrana de las células glómica en presencia de lactato (Figura 58).

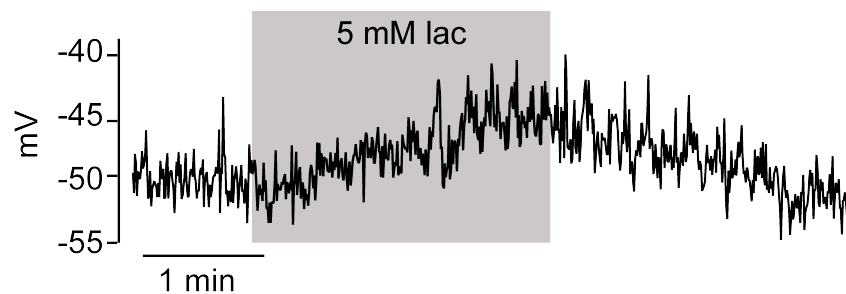


Figura 58. El lactato induce una despolarización del potencial de membrana en las células glómicas. Registro representativo de la despolarización del potencial de membrana de una célula glómica en respuesta a lactato. Este registro se ha reproducido en 8/6 células/ratones.

A continuación estudiamos el efecto del lactato sobre las corrientes iónicas registradas en células glómicas utilizando la configuración de parche perforado aplicando un protocolo de rampa en *voltage-clamp* (Figura 59 A, arriba); (ver “Métodos”). Este protocolo permite registrar tanto los canales *background*, como los canales voltaje dependientes de potasio, y medir el umbral de activación de estos últimos. El análisis de los registros electrofisiológicos demostró la existencia de dos tipos de células glómicas en función de su respuesta a lactato. En un tipo, el lactato produce un desplazamiento a la derecha del umbral de activación de los canales de potasio dependientes de potencial (ver flechas en la Figura 59 A) y una inhibición de la corriente macroscópica (Figura 59 A), lo que explica la despolarización inducida por lactato. En el segundo tipo, se distinguen tres fenómenos en respuesta a lactato: i) un aumento de la corriente de entrada (*holding current*) a potenciales de reposo (ver cuadrado en la Figura 59 B); ii) un cambio hacia valores más negativos del umbral de activación de los canales de potasio dependiente de potencial; y iii) un aumento de la amplitud de la corriente voltaje dependiente de potasio. El papel de estos dos tipos celulares en la respuesta a lactato mediada por el CC es todavía desconocido (ver “Discusión”).

3.3. Mecanismos moleculares involucrados en la activación por lactato de las células glómicas

Una vez demostrado que el CC es capaz de activarse en respuesta a lactato se analizaron los mecanismos moleculares que subyacen a dicha activación.

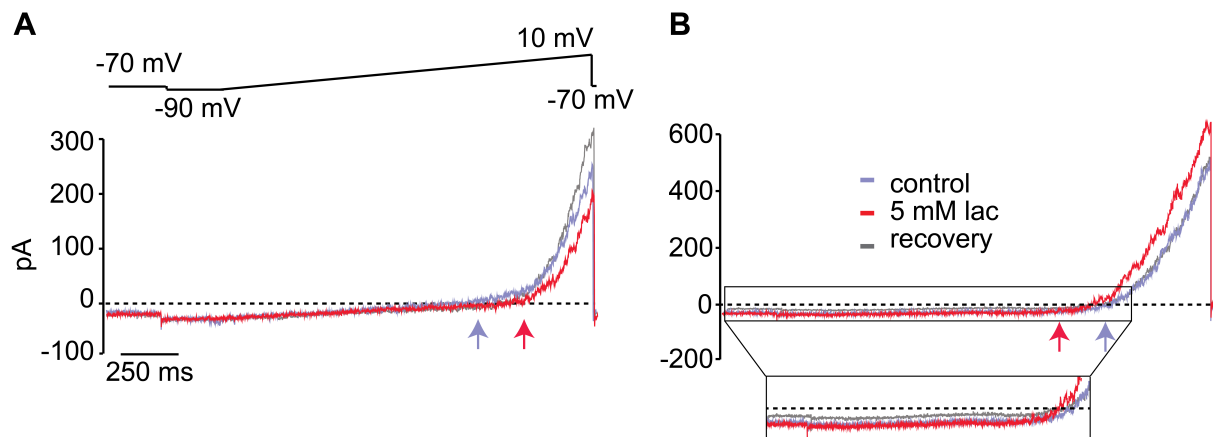


Figura 59. Caracterización electrofisiológica de la respuesta a lactato. (A) Arriba: esquema del protocolo de rampa utilizado para los registros. Abajo: registro representativo del tipo celular donde se inhibe la corriente macroscópica de potasio (12 células de las 23 registradas). (B) Registro representativo del tipo celular donde se incrementa la corriente de potasio (11 células de las 23 registradas). En el cuadrado: ampliación de las corrientes *background*. Control: azul, Lactato: rojo y Recuperación en gris.

3.3.1. Efecto del lactato sobre el pH intra y extracelular

Durante años se ha considerado que la lactatemia conlleva una disminución del pH de la sangre que, entre otras acciones, es responsable de la fatiga muscular producida durante el ejercicio (Fletcher, 1907; Hill, 1914; Hill y Lupton, 1923). Teniendo en cuenta que el CC es un sensor polimodal que se activa también en respuesta a la acidosis (Eyzaguirre y Koyano, 1965), decidimos estudiar si esta es la causa de la activación de las células glómicas en respuesta a lactato. Para evitar la acidificación del medio se utilizaron soluciones donde el lactato sódico sustituyó estequiométricamente al cloruro sódico y se comprobó que las distintas concentraciones de lactato en la solución de registro extracelular no provocaban una disminución del pH (Figura 60 A).

Por otra parte, el lactato se encuentra fisiológicamente como anión y es cotransportado a través de la membrana celular con un protón (Dubouchaud *et al.*, 2000; García *et al.*, 1994; Roth y Brooks, 1990). Este transporte es bidireccional y se lleva a cabo por la familia de transportadores MCTs, permitiendo que los tejidos elegir entre liberación y captación de lactato en función de su concentración y el gradiente de pH (García *et al.*, 1994; Price *et al.*, 1998); (ver “Introducción”). Es posible que al incrementar las concentraciones de lactato en el medio extracelular este sea transportado al interior de la célula y produzca una acidificación del pH intracelular que pudiera explicar la activación de las células glómicas por lactato. La medición del pH intracelular en células glómicas dispersas con microfluorimetría (ver “Métodos”) muestra que el pH intracelular no se ve afectado por la concentración de lactato

extracelular, sin embargo, si se acidifican al exponerlas a hipercapnia por activación de la anhidrasa carbónica intracelular (Figura 60 B).

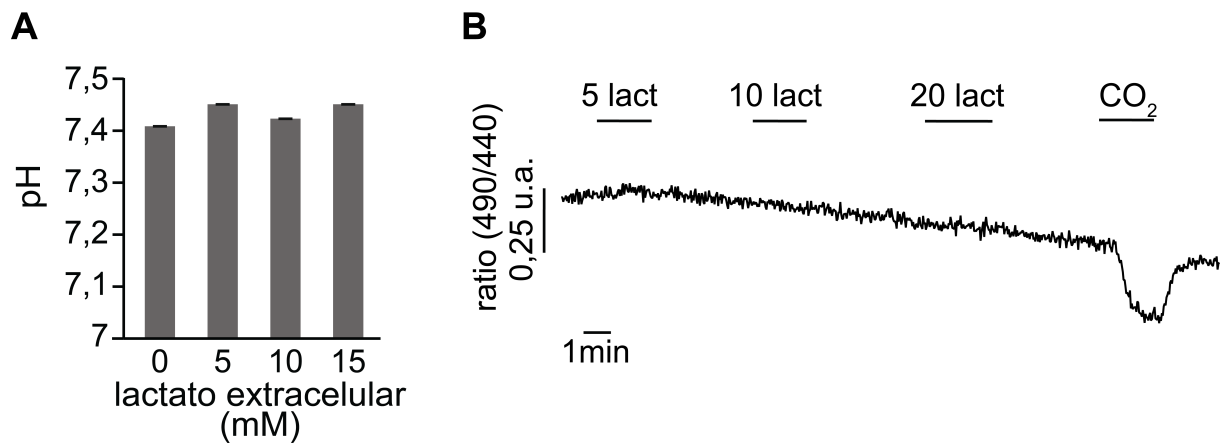


Figura 60. El incremento de lactato no modifica el pH extracelular ni intracelular en células glómicas de CC. (A) Medición del pH de la solución externa de registro con diferente concentración de lactato. Nótese que no existen diferencias significativas. (B) Registro representativo de la variación de pH intracelular a distintas concentraciones de lactato. Nótese que no varía cuando le aplicamos lactato, pero si cuando se le aplica hipercapnia. u.a. unidades arbitrarias.

3.3.2. Incremento de NADH intracelular inducido por lactato

El lactato intracelular se convierte a piruvato por la LDH produciendo NADH (Gutmann y Wahlefeld, 1974) (ver “Introducción”). Se conoce que en respuesta a hipoxia hay una acumulación de NADH que contribuye a la activación de las células glómicas (Fernández-Agüera *et al.*, 2015); (ver “Introducción”). Por lo que estudiamos si hay un incremento de NADH durante la exposición a lactato y comparamos la señal de NADH obtenida con la registrada en hipoxia. Estos experimentos se llevaron a cabo usando la técnica de autofluorescencia de NADH en células glómicas aisladas (ver “Métodos”). Los resultados que obtuvimos mostraron que la hipoxia y el lactato producen un incremento similar de NADH en las células glómicas (Figura 61 A y B), aunque tienen cinéticas diferentes. El tiempo en el que se alcanza la mitad del incremento máximo de NADH ($t_{1/2}$) es menor durante la aplicación de lactato que durante la exposición a hipoxia (Figura 61 C). Estos resultados indican que el incremento de NADH durante la exposición a lactato (5 mM) es más rápido que en hipoxia, aunque la señal sea de una amplitud similar.

Para estudiar si el incremento de NADH es proporcional a los cambios en la concentración de lactato se llevó a cabo estudio de “dosis dependencia”. Los resultados mostraron un incremento gradual de la autofluorescencia de NADH a medida que aumentaban los niveles de lactato extracelularmente (Figura 62).

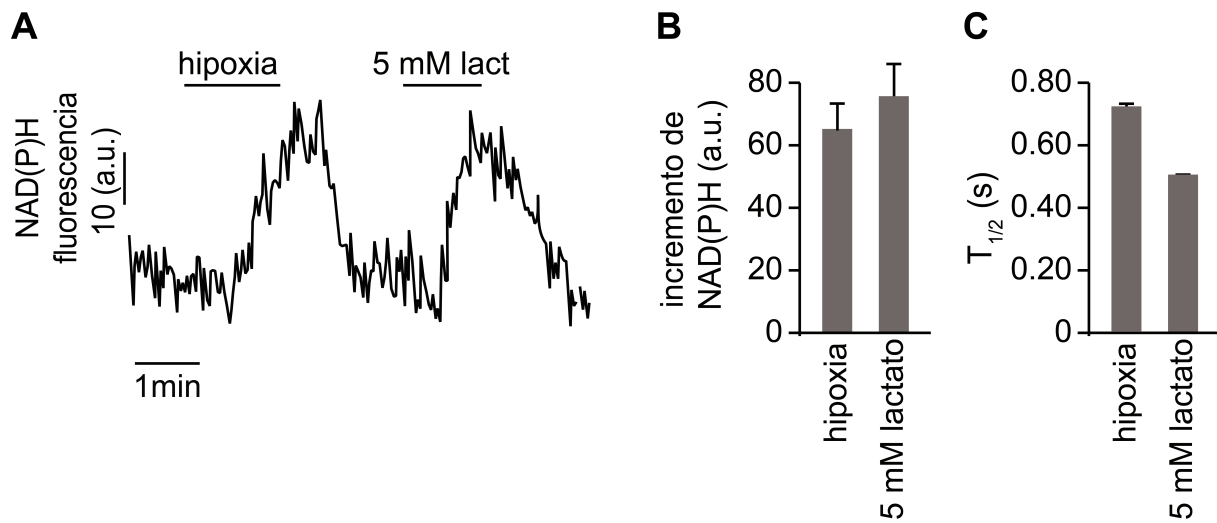


Figura 61. Incremento de NADH en respuesta a lactato. (A) Registros representativos de cambios de NADH en respuesta a hipoxia y a lactato en células glómicas. (B) Promedio del incremento de autofluorescencia de NADH en células glómicas durante hipoxia y lactato. (hipoxia: $68,09 \pm 8,57$ u.a. y lactato: $81,23 \pm 10,86$ u.a. en 22/6 células/cultivos). (C) Promedio del $T_{1/2}$ durante hipoxia y lactato en células glómicas. (hipoxia: 0,71 s y lactato: 0,57 s en 22/6 células/cultivos). Los datos representan la media \pm SEM. u.a., unidades arbitrarias.

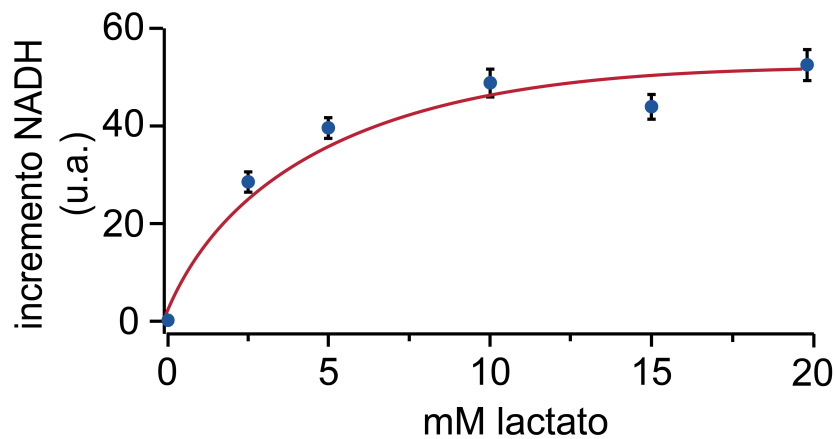


Figura 62. Respuesta gradual de NADH a diferentes concentraciones de lactato. (A) Cuantificación del incremento inducido por distintas concentraciones de lactato (2,5 mM lactato: $27,30 \pm 4,46$ u.a.; 5 mM lactato: $38,48 \pm 4,72$ u.a.; 10 mM lactato: $48,23 \pm 6,49$ u.a.; 15 mM lactato: $42,61 \pm 5,28$ u.a.; 20 mM lactato: $51,64 \pm 6,48$ u.a. en 33/7 células/cultivos). La línea de ajuste (roja) está trazada a ojo. Los datos representan la media \pm SEM. u.a. unidades arbitrarias.

3.4. La modulación del ratio NADH/NAD⁺ afecta a la respuesta a lactato de las células glómicas de cuerpo carotideo

Para determinar si la señal de NADH registrada durante la exposición a lactato se correlaciona con la secreción inducida por lactato en el CC, se llevaron a cabo varios experimentos donde se modificó el ratio NADH/NAD⁺ y se comprobó su efecto sobre la tasa de secreción inducida en rodajas de CC.

3.4.1. Efecto de la regeneración de NAD⁺ en la respuesta a lactato

El piruvato es un agente regenerador de NAD⁺ porque, gracias a la LDH, se convierte a lactato consumiendo NADH. Para confirmar que la señal de NADH que registramos tras la exposición a lactato se debe a esa reacción mediada por la LDH aplicamos lactato y piruvato simultáneamente. El incremento de NADH en respuesta a lactato se inhibió reversiblemente en presencia de 10 mM piruvato (Figura 63 A). Un mismo efecto inhibitorio del piruvato se observó en registros de actividad secretora inducida por lactato (Figura 63 B y C). En algunos casos la inhibición producida por piruvato fue completa (Figura 64 B), pero en otros casos después de la inhibición se observó un incremento de la tasa de secreción durante la exposición a piruvato (Figura 63 C), lo que sugiere que el piruvato podría producir un incremento retardado en los niveles intracelulares de NADH. De hecho, los registros de autofluorescencia en las células glómicas indican que el piruvato produce un pequeño incremento retardado de NADH cuando se aplica durante varios minutos (Figura 64 A), lo que, como se indicó anteriormente, podría explicar el incremento de la tasa de secreción observado al final de la incubación con piruvato (Figura 64 B). La activación retardada de las células glómicas por piruvato podría ser la consecuencia de la activación del ciclo de Krebs o de un incremento de lactato intracelular que promoviese a su vez la secreción celular. No obstante, en esta Tesis Doctoral no se estudia la acción de piruvato ya que se empleó normalmente como herramienta farmacológica a dosis muy superiores a las que se encuentran normalmente en el plasma.

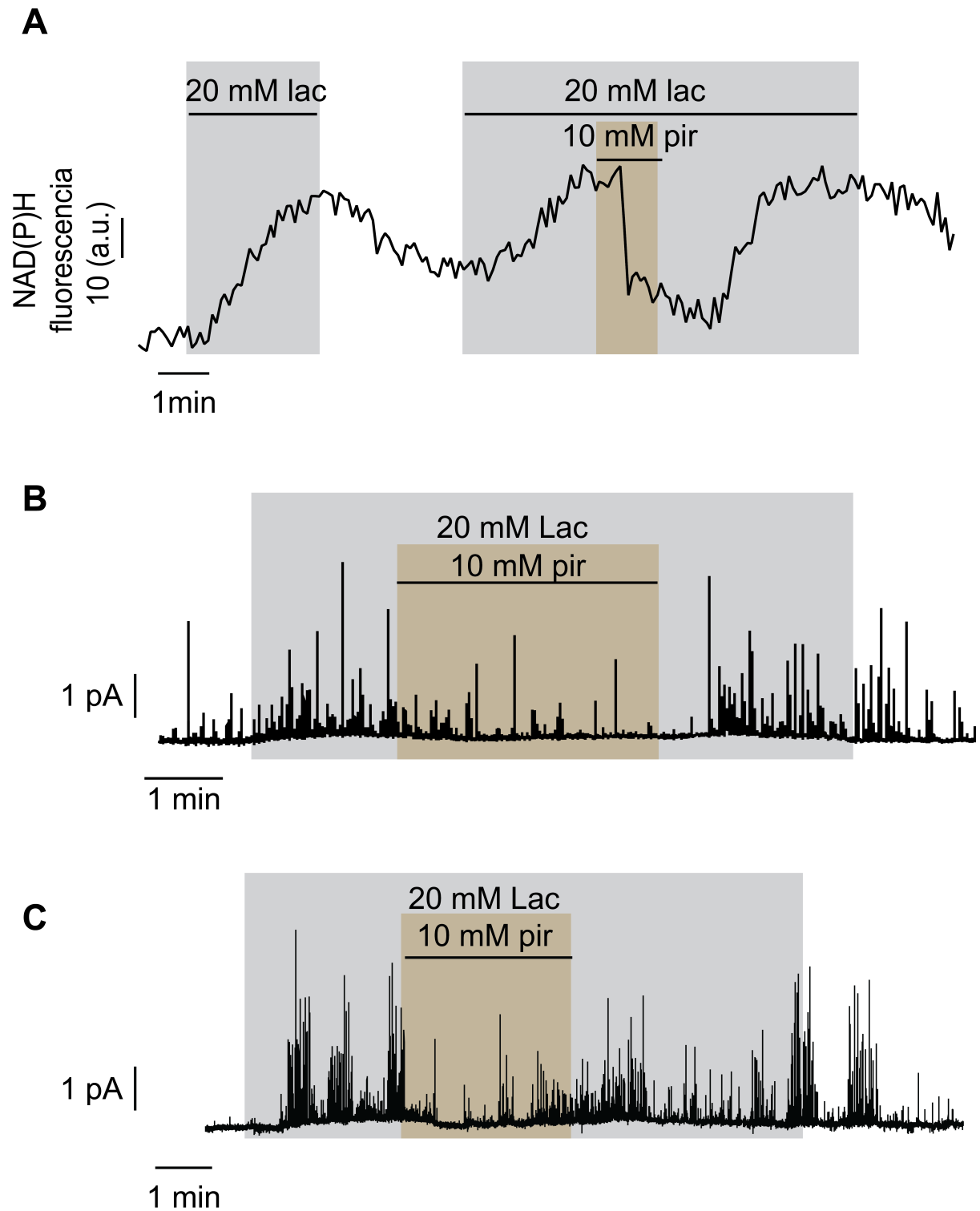


Figura 63. Inhibición de la respuesta a lactato por piruvato. (A) Registro representativo de NADH donde se muestra una inhibición reversible del incremento del NADH durante la exposición a lactato por piruvato. (B-C) Registro representativo de amperometría donde se muestra una inhibición de la tasa de secreción durante la exposición a lactato por piruvato completa (B) y parcial (C). u.a. unidades arbitrarias.

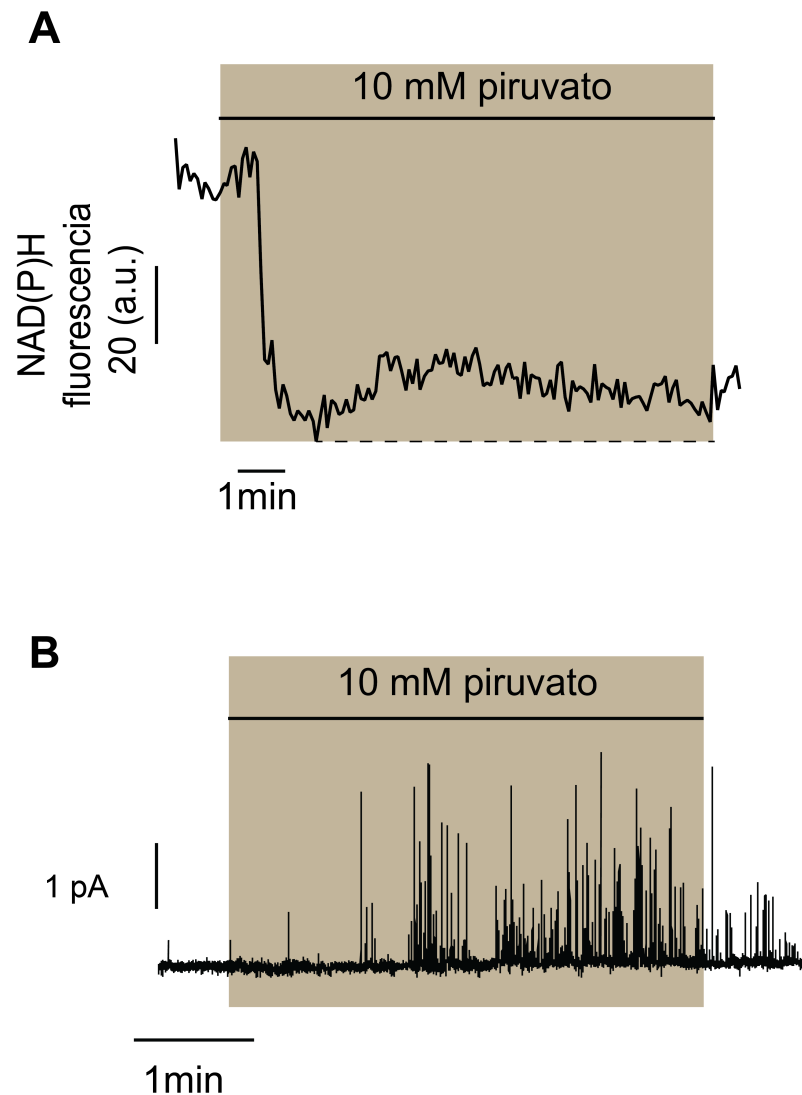


Figura 64. Activación de las células glómicas por piruvato. (A) Registro representativo del incremento de NADH de las células glómicas durante la exposición a piruvato. (B) Registro representativo del incremento de la tasa de secreción durante la exposición a piruvato. u.a. unidades arbitrarias.

3.4.2. Efecto sumatorio de la hipoxia y el lactato sobre la actividad de las células glómicas

Para confirmar la posible acción potenciadora del lactato sobre otras respuestas de las células glómicas se analizó el efecto de aplicar hipoxia y lactato simultáneamente, basándonos en que ambos estímulos producen un incremento de NADH (Figura 61). Los resultados mostraron que la exposición de células glómicas a hipoxia durante el tratamiento con lactato provocó una potenciación reversible de la señal de la autofluorescencia de NADH (Figura 65).

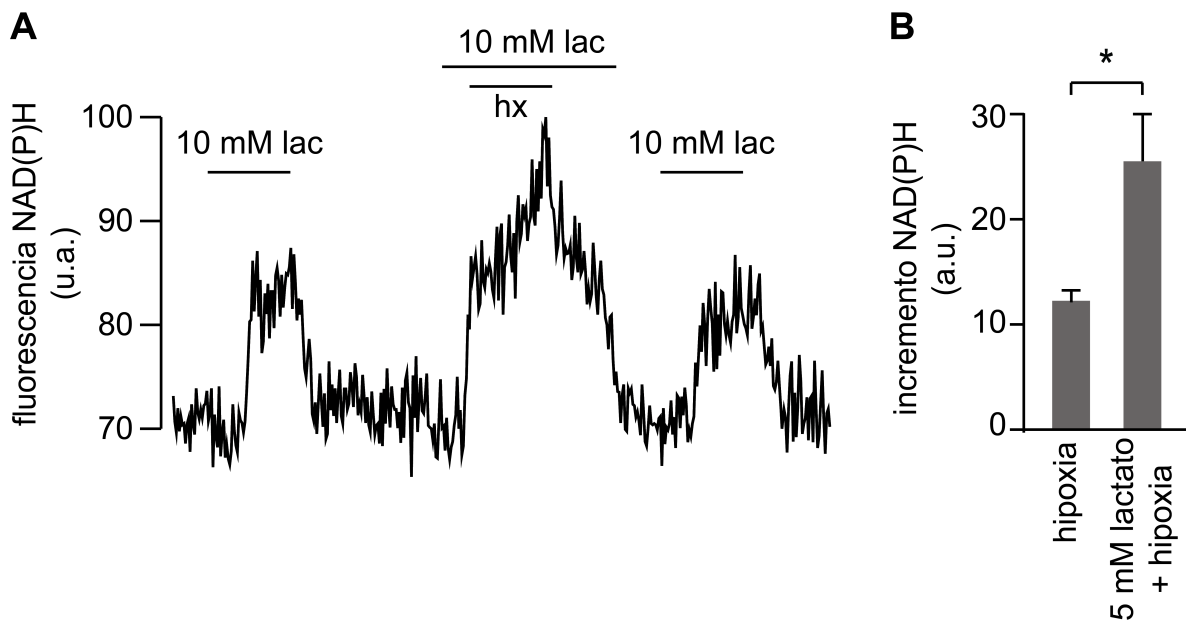


Figura 65. Potenciación de la respuesta a lactato de NADH por hipoxia. (A) Registro representativo que muestra los cambios de NADH en células glómicas dispersas durante la exposición a hipoxia y lactato. La señal hipóxica de NADH potencia reversiblemente la respuesta a lactato. (B) Cuantificación del aumento de la fluorescencia de NADH durante la hipoxia e hipoxia más lactato (hipoxia: $13,37 \pm 1,35$ u.a. e hipoxia más lactato: $27,25 \pm 4,42$ u.a. en 5/5 células/ratones). u.a., unidades arbitrarias. Los datos representan la media \pm SEM. * $p < 0.05$.

Finalmente se estudió si el incremento del ratio NADH/NAD^+ observado cuando se aplica lactato e hipoxia juntos se traduce en una potenciación de la respuesta a hipoxia en presencia de lactato extracelular. Los resultados obtenidos mostraron que la tasa de secreción a hipoxia aumentó significativamente y de forma reversible cuando las rodajas fueron expuestas a hipoxia durante el tratamiento con lactato (Figura 66 A-C). No obstante, llamó nuestra atención que esta potenciación de la respuesta a hipoxia fue visible incluso en rodajas de CC que no respondían a lactato (Figura 66 B), y también en aquellas donde ambos estímulos se aplicaron simultáneamente (Figura 66 C). El efecto de potenciación producido por el lactato sobre la hipoxia puede ser importante a nivel de la respuesta fisiológica adaptativa a hipoxia aguda, situación fisiológica que se ve acompañada de un incremento transitorio en las concentraciones de lactato en sangre (ver “Discusión”).

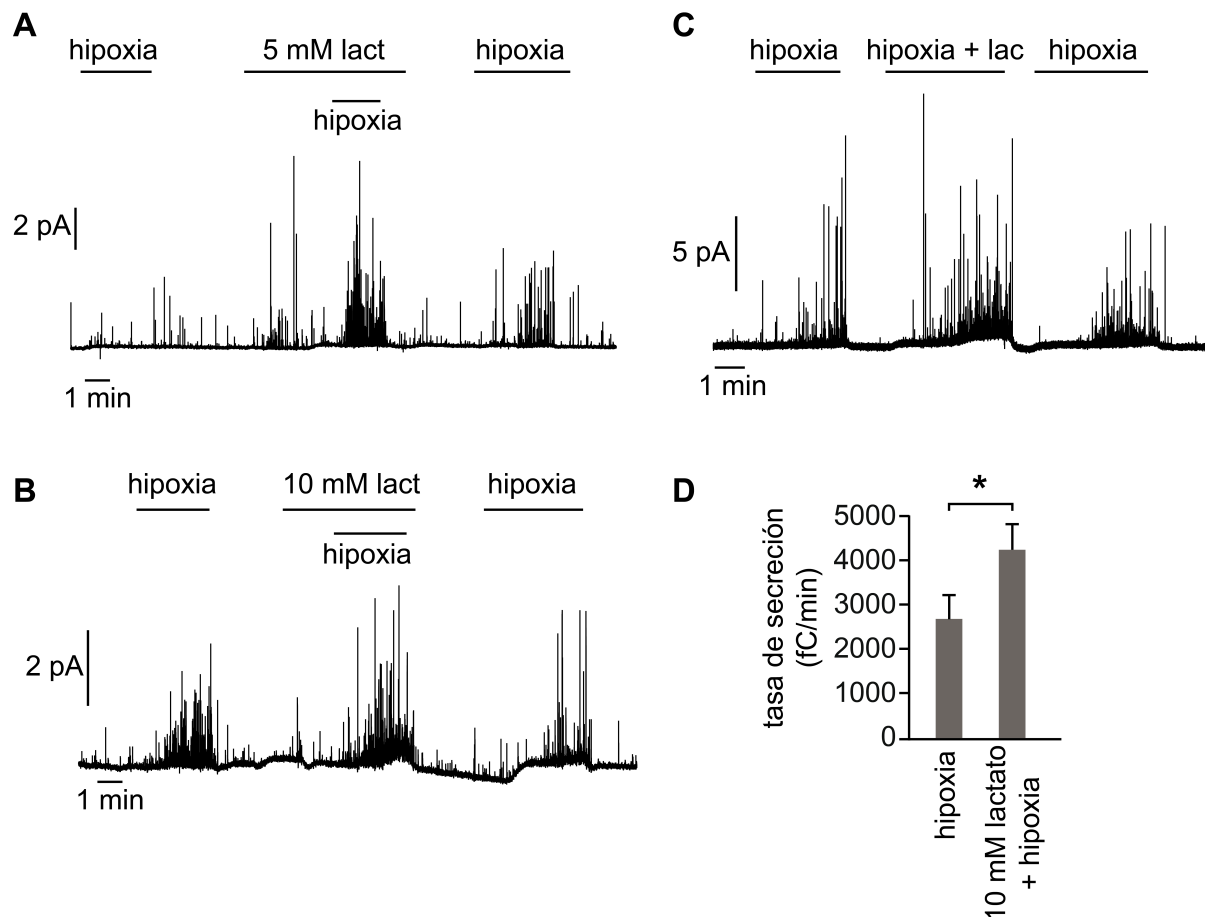


Figura 66. Potenciación de la respuesta secretora a hipoxia por lactato. (A-C) Registros representativos de amperometría donde se muestra una potenciación de la respuesta secretora a hipoxia y lactato juntos. (D) Cuantificación de la tasa de secreción promedio durante la hipoxia e hipoxia más lactato en células glómicas (hipoxia: 2752 ± 526 fC/min e hipoxia más lactato: 4228 ± 543 fC/min en 20/10 registros/cultivos). Los datos representan la media \pm SEM. * $p < 0.05$.

Por lo tanto, podemos afirmar que el incremento de lactato durante hipoxia tiene un efecto sumatorio en la activación del CC observado a nivel de secreción dopaminérgica. Además, los resultados demuestran que la tasa de secreción está relacionada directamente con el ratio NADH/NAD^+ . Sugerimos que durante hipoxia el incremento de lactato en sangre ocurre para potenciar la activación del CC (ver “Discusión”).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La detección de hipoxia de forma aguda es una propiedad fundamental de los quimiorreceptores arteriales que permite a los organismos mantener la homeostasis del medio interno en condiciones de escasez de O₂ modulando rápidamente la función respiratoria y cardiovascular. El mecanismo de quimiotransducción que se activa en respuesta a hipoxia ha sido ampliamente estudiado en preparaciones de CC, principal quimiorreceptor periférico, y actualmente existe un amplio consenso en torno al modelo de membrana de quimiotransducción que se basa en la inhibición de canales de K⁺ sensibles a O₂ en la membrana de las células quimiosensoras (células glómicas) y la entrada de Ca²⁺ extracelular (ver “Introducción”). No obstante, la naturaleza de la molécula (o moléculas) “sensora(s) de O₂” ha sido motivo de debate en las últimas décadas. Nuestro grupo ha propuesto que la interacción entre la mitocondria y los canales de la membrana es un proceso fundamental en la detección aguda de la hipoxia (Ortega-Sáenz *et al.*, 2003). Esta hipótesis ha sido postulada recientemente al demostrar que la actividad del CMI de las células glómicas del CC es necesaria para la respuesta a la hipoxia (Fernández-Agüera *et al.*, 2015). En paralelo, otro grupo ha propuesto que el receptor olfatorio atípico Olfr78 es un sensor de lactato y que el aumento de lactato durante la hipoxia aguda activa al CC para producir hiperventilación (Chang *et al.*, 2015). En esta Tesis Doctoral hemos completado la caracterización de la respuesta a hipoxia en ratones con disfunción genética condicional del CMI (ratones KO para el gen *Ndufs2*; modelo ESR-NDUFS2) y se ha estudiado en detalle el papel del receptor Olfr78 en la respuesta a hipoxia aguda y a lactato. Además, hemos analizado si el CC es capaz de detectar los cambios fisiológicos en los niveles de lactato extracelular.

1. Modelo de señalización mitocondrial dependiente del CMI en respuesta a hipoxia aguda

1.1. La activación del cuerpo carotídeo en respuesta a hipoxia depende del CMI

Resultados previos de nuestro grupo de investigación han mostrado que la delección embrionaria del gen *Ndufs2*, que codifica una subunidad esencial para la actividad catalítica del CMI (Baradaran *et al.*, 2013; Hirst, 2013), en los tejidos catecolaminérgicos (ratón TH-NDUFS2), da lugar a la abolición de la respuesta ventilatoria a hipoxia, sin afectarse la respuesta sistémica a hipercapnia. Los estudios *in vitro* del CC de este modelo animal han sugerido que durante una disminución de O₂ hay un enlentecimiento de la CTE, lo que conlleva a una acumulación de CoQH₂ al enlentecimiento o reversión del CMI y al

incremento de los niveles de NADH y ROS. Estas dos moléculas actuarían como señalizadoras inhibiendo los canales de K^+ de la membrana plasmática y produciendo la despolarización, entrada de calcio extracelular y liberación de neurotransmisores (Fernández-Agüera *et al.*, 2015) (Figura 67 C).

El modelo TH-NDUFS2 tiene varias limitaciones. La primera es que, al tratarse de un modelo con delección embrionaria de un gen, la pérdida a la sensibilidad a hipoxia aguda podría deberse a una adaptación producida durante el desarrollo embrionario en respuesta a dicha mutación. La segunda limitación es que los niveles de NADH y ROS en las células glómicas de este modelo animal están muy altos, lo que podría afectar a su función como moléculas señalizadoras. En particular, los niveles altos de NADH inhiben las deshidrogenas mitocondriales (que participan en el ciclo de Krebs) y producen una paralización del metabolismo mitocondrial. Para tratar de solventar estas limitaciones y profundizar en el estudio de la implicación del gen *Ndufs2* como subunidad esencial del CMI para la activación de la respuesta a hipoxia en el CC, se generó un modelo animal condicional adulto (ESR-NDUFS2) (Fernández-Agüera *et al.*, 2015), y se llevó a cabo la caracterización de su respuesta fisiológica y celular a hipoxia aguda.

La delección de la subunidad *Ndufs2* afecta drásticamente a la función del CMI (Kashani-Poor *et al.*, 2001). Se ha descrito que la delección condicional de *Ndufs2* en ratones adultos, da lugar a ratones *knockout* donde el CMI no se ensambla (Fernández-Agüera *et al.*, 2015), por lo que, como mostramos en este trabajo, la actividad enzimática NADH/oxidoreductasa disminuye gradualmente tras el tratamiento con TMX (Figura 67 B), permitiendo el estudio del curso temporal de la abolición de la respuesta a hipoxia dependiente del lavado de la proteína *Ndufs2*. En paralelo a la pérdida de actividad del CMI, los animales *knockout* del modelo ESR-NDUFS2, muestran una abolición selectiva y gradual de la RVH, aunque los parámetros respiratorios de estos animales en normoxia son normales y, además, son capaces de hiperventilar durante hipercapnia. A nivel celular, la capacidad del CC para secretar dopamina en respuesta a hipoxia aguda se pierde selectiva y gradualmente tras el tratamiento con TMX. De hecho, el incremento de calcio citoplasmático, que se produce en las células glómicas del CC en respuesta a hipoxia aguda (Ureña *et al.*, 1994), como paso previo a la liberación de neurotransmisores, también se encuentra abolido en las células glómicas de los ratones ESR-NDUFS2 cuando la proteína *Ndufs2* está completamente lavada. La falta de incremento de calcio citosólico y la abolición de secreción dopaminérgica en respuesta a hipoxia ocurrió mientras se mantuvo inalterada la respuesta a hipercapnia o a hipoglucemia, lo cual demuestra el buen estado fisiológico de las células glómicas de este

modelo animal y que la activación en el CC por estos estímulos no depende de la funcionalidad del CMI. Estas observaciones apoyan datos previos de nuestro grupo donde se demuestra que la inhibición farmacológica del sitio de unión a ubiquinona del CMI elimina la respuesta a hipoxia selectivamente sin afectar a la respuesta a hipoglucemia (García-Fernández *et al.*, 2007).

En resumen, en el modelo ESR-NDUFS2, la pérdida gradual y selectiva de la respuesta a hipoxia fue tanto a nivel sistémico como a nivel celular, y ocurrió en paralelo con la disminución de la actividad NADH/ubiquinona oxidoreductasa tras el tratamiento con TMX. Esto posiblemente se debe al tiempo de recambio de la proteína Ndufs2 (Kim *et al.*, 2012), indicando que cuando se lava por completo la subunidad Ndufs2 del CMI desaparece la sensibilidad a la disminución de PO₂ en las células quimiosensitivas del CC.

1.2. NADH y ROS, moléculas señalizadoras en respuesta a hipoxia

Aunque en condiciones normales el CMI funciona oxidando NADH y produciendo CoQH₂ (Figura 67 A), se sabe que la función catalítica del CMI es reversible. En diversas circunstancias (por ejemplo, en presencia de niveles altos de succinato) el CMI puede revertirse y producir NADH y ROS (Votyakova y Reynolds, 2001; Liu *et al.*, 2002; Lambert y Brand, 2004). De hecho, la tasa de producción de ROS en el modo reverso del CMI es la más alta que tiene lugar en la mitocondria (Murphy, 2009). La funcionalidad fisiológica del modo reverso del CMI se desconoce. Durante hipoxia aguda las células glómicas sufren una acumulación de NADH y ROS reversible, que se abole en células con déficit embrionario en *Ndufs2* (Fernández-Agüera *et al.*, 2015), por lo que se ha sugerido que la acumulación de ambas moléculas podría deberse al enlentecimiento o la reversión del CMI. Las células glómicas con déficit embrionario de *Ndufs2* presentan altas concentraciones basales de ROS y NADH (Fernández-Agüera *et al.*, 2015), y a nivel electrofisiológico, la resistencia de entrada y el potencial de membrana, son significativamente distintos a los de los ratones controles. Estos datos sugieren que la deficiencia del CMI podía producir un efecto de “hipoxia mantenida” (Fernández-Agüera *et al.*, 2015) que explicase la pérdida de la respuesta a hipoxia.

Nuestros resultados demuestran que las células glómicas de los ratones ESR-NDUFS2 son un buen modelo para el estudio de hipoxia aguda en el CC, puesto que los niveles basales de ROS, medidos en citosol, son similares a los de las células glómicas controles, y aunque, la concentración de NADH basal en estos ratones es significativamente mayor que la registrada en células glómicas controles, este valor es menor que el registrado en células glómicas de

ratones TH-NDUFS2. Además, las células glómicas de los ratones ESR-NDUFS2 tienen parámetros electrofisiológicos, resistencia de entrada y potencial de membrana, similares al de las células controles a diferencia de las células del modelo embrionario TH-NDUFS2.

En respuesta a hipoxia aguda hay un incremento de la frecuencia respiratoria cuando la PaO₂ disminuye por debajo de 60 mmHg. La relación entre la disminución de PaO₂ y la activación de la respuesta respiratoria es inversamente proporcional (Rhoades y Bell, 2012). Esta dependencia también se observa al nivel de las células quimiosensitivas del CC, las cuales sufren una activación (entrada de calcio y secreción dopaminérgica) dependiente de O₂ (Ver “Introducción”), (Ureña *et al.*, 1994; Ortega-Sáenz *et al.*, 2006). Apoyando nuestra hipótesis que describe que en las células glómicas hay un incremento de NADH en respuesta a hipoxia (Fernández-Agüera *et al.*, 2015) mostramos que en dichas células, la acumulación de NADH también es inversamente proporcional a la disminución de O₂ (Duchen y Biscoe, 1992b; Buckler y Turner, 2013). El incremento de NADH durante hipoxia posiblemente se produzca a nivel del CMI ya que: I) Las células glómicas controles expuestas a rotenona, que bloquea tanto el funcionamiento directo como el reverso del CMI (Votyakova y Reynolds, 2001; Liu *et al.*, 2002; Lambert y Brand, 2004), sufren un incremento de NADH similar al registrado durante hipoxia, y promueven la secreción catecolaminérgica (Ortega-Sáenz *et al.*, 2003); II) Las células glómicas con déficit en *Ndufs2* (TH-NDUFS2 y ESR-NDUFS2) no muestran un incremento de NADH ante una disminución de O₂ (ver “Resultados”); (Fernández-Agüera *et al.*, 2015). III) El CMI de las células glómicas de los ratones ESR-NDUFS2 no es funcional ya que no incrementan NADH en respuesta a rotenona ni a hipoxia.

Existe en la literatura un amplio y extenso debate sobre si en hipoxia se produce un incremento o decremento de ROS (Archer *et al.*, 1993; Michelakis *et al.*, 2004; Murphy, 2009; Waypa *et al.*, 2010). Nuestro grupo ha descrito que durante hipoxia también hay un incremento de ROS en las células glómicas del CC dependiente del CMI (Fernández-Agüera *et al.*, 2015). Estos datos apoyan resultados previos que demuestran que la mayor tasa de producción de ROS ocurre durante la reversión de la actividad catalítica del CMI (Murphy, 2009), aunque hay producción de ROS a nivel de otros complejos mitocondriales (Waypa *et al.*, 2013). Nosotros mostramos que la pérdida de la respuesta a ROS en hipoxia no se debe al elevado nivel basal de oxidación de las células glómicas con déficit embrionario en *Ndufs2*, ya que más del 50% de las células glómicas de los ratones ESR-NDUFS2 tienen abolido el incremento de ROS-EIM en respuesta a hipoxia, siendo su nivel de oxidación basal similar al

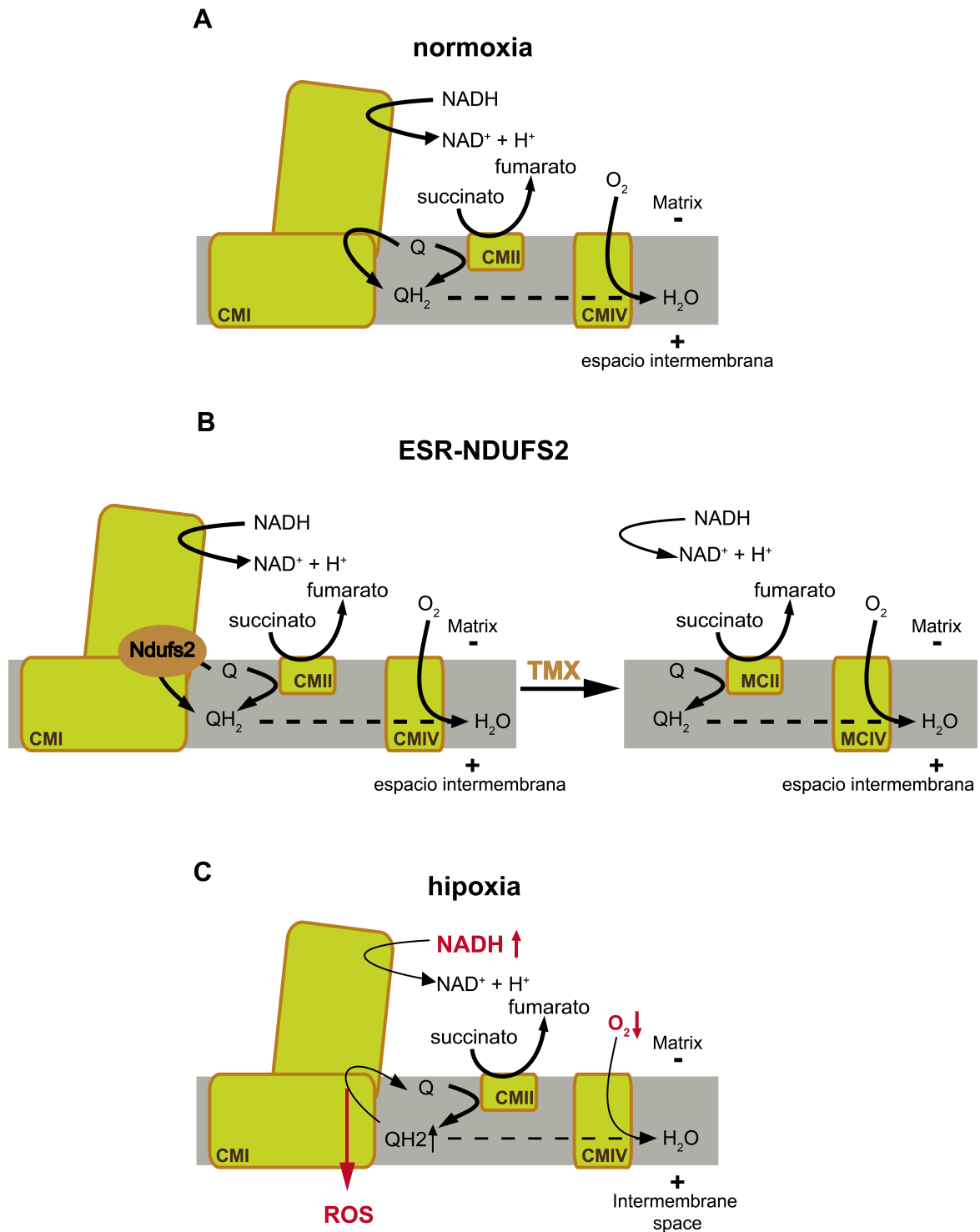


Figura 67. Modelo de la sensibilidad a hipoxia aguda en la CTE de las células glómicas del cuerpo carotídeo. A) Funcionamiento de la CTE en normoxia. B) (izq) Localización de la subunidad Ndufs2 en el CMI. (drch) esquema representativo de una CTE donde el CMI no se ensambla. (C) Modelo de la CTE en respuesta a hipoxia. Nótese el acúmulo de QH₂, NADH y la producción ROS. El grosor de las flechas es proporcional a la dirección de la reacción. CoQ: quinona oxidada; CoQH₂: quinona reducida.

de las células controles. El aumento de ROS en las células ESR-NDUFS2, durante hipoxia, fue significativamente menor que el registrado en células controles. Esta leve señal de ROS

durante hipoxia en células ESR-NDUFS2, cuya fuente pueden ser otros complejos mitocondriales (Liu *et al.*, 2002; Waypa *et al.*, 2013) o deberse a que la proteína Ndufs2 no se ha lavado completamente (Kim *et al.*, 2012), no es suficiente para activar el CC ante una disminución de PO₂. Estas observaciones indican que es necesario una elevada producción de ROS-EIM y de NADH a nivel del CMI para señalar los canales de la membrana plasmática (Figura 68).

Se ha descrito que el incremento de ROS inhibe los canales de membrana de potasio e induce la VPH (Waypa *et al.*, 2001; Fernández-Agüera *et al.*, 2015). Apoyando estos hallazgos mostramos que las células glómicas dializadas con H₂O₂, un agente oxidante, sufren un aumento de la resistencia de entrada celular, similar a el registrado en hipoxia. El incremento de la resistencia de entrada puede explicar la despolarización que se observa en hipoxia por una inhibición de los canales de fuga de potasio. Además, se conoce que existe un sistema similar, basado en la regulación redox de canales de K⁺, para describir la sensibilidad a hipoxia de los miocitos de la arteria pulmonar (Archer *et al.*, 2010; Waypa *et al.*, 2010). En concreto, se ha señalado al CMIII como el responsable de desencadenar el proceso de VPH (Waypa *et al.*, 2013).

Estos recientes hallazgos ponen de manifiesto que la pérdida selectiva de la respuesta a hipoxia observada en animales con déficit embrionario del gen *Ndufs2* no fue por una adaptación compensatoria génica durante el desarrollo embrionario o por el alto nivel basal de NADH y ROS, si no por la falta de funcionalidad del CMI.

1.3. Respuesta a hipoxia con regeneración química de NAD⁺

Como se indicó anteriormente, los niveles de NADH basales de las células glómicas con déficit inducido de *Ndufs2* son mayores que los de las células glómicas control, lo que podría provocar la inhibición del metabolismo mitocondrial (Birsoy *et al.*, 2015; Sullivan *et al.*, 2015) y explicar la falta de respuesta a hipoxia celular y sistémica en este modelo animal (ESR-NDUFS2).

El presente trabajo muestra que es posible disminuir los niveles basales de NADH en las células glómicas aplicando regeneradores de NAD⁺ tanto de forma aguda como crónicamente. Para ello, hemos utilizado piruvato o α -cetobutirato (α KB). Nuestros resultados demuestran que ambos agentes secuestran NADH, tanto en células controles como en células con déficit en *Ndufs2*, y que el α KB tiene mayor eficiencia que el piruvato debido a su conversión a α HB no metabolizable (Sullivan *et al.*, 2015). El piruvato puede metabolizarse a lactato y regenerar NAD⁺, o entrar en el ciclo de Krebs y favorecer la producción de NADH,

que posteriormente es utilizado por el CMI para activar la CTE (Sullivan *et al.*, 2015). La disminución de los niveles basales de NADH no afectó a la capacidad de las células glómicas controles para responder a hipoxia, aunque la amplitud del incremento de NADH en presencia de α KB es menor. No obstante, a pesar de que el ratio de NADH/NAD⁺ disminuyó significativamente en las células deficientes en *Ndufs2* tratadas agudamente con ambos agentes, no se recuperó la respuesta a hipoxia. Esta respuesta se mantuvo abolida cuando las células ESR-NDUFS2 se incubaron crónicamente con α KB, aunque en esta condición los niveles basales de NADH llegaron casi a los valores registrados en las células controles.

Las células de los ratones ESR-NDUF2 tienen un CMI disfuncional (Figura 67 B), lo que podría ralentizar la CTE y afectar a la capacidad de las células glómicas para ser activadas por hipoxia. El dimetil succinato (DMSuc), sustrato del CMII, favorece la activación de la CTE vía CMII-CMIV. La incubación crónica y simultánea con α KB, que disminuye los niveles basales de NADH, y DMSuc, que activa la CTE vía CMII, no fue capaz de recuperar la capacidad de responder a hipoxia en las células glómicas de los ratones ESR-NDUFS2, enfatizando la importancia del CMI para promover la respuesta a hipoxia.

En conjunto estos resultados sugieren que el nivel de NADH basal no es el responsable de la pérdida de la respuesta a hipoxia descrita en las células glómicas con déficit embrionario en *Ndufs2*.

1.4. Ratio CoQH₂/CoQH y respuesta aguda a hipoxia en las células glómicas

El CMI no se ensambla en las células glómicas de ratones ESR-NDUFS2 y por ello pierden su actividad oxidoreductasa, aunque mantienen la mayor parte de sus propiedades funcionales, incluida la síntesis de ATP y la capacidad para responder a otros estímulos como la hipoglucemia y la hipercapnia (Fernández-Agüera *et al.*, 2015), demostrando que el CC es muy resistente a la disfunción del CMI. En contraste con estos resultados, los ratones con mutación génica en el CMII, sufren una marcada muerte celular a nivel de CC (Díaz-Castro *et al.*, 2012), sugiriendo que la ruta CMII-CMIV, es esencial para la supervivencia de las células glómicas (Fernández-Agüera *et al.*, 2015). Nuestro grupo ha descrito la existencia de características metabólicas especiales de las células glómicas que las diferencia de otros tejidos como GCS, con idéntico origen embrionario pero incapaces de responder a hipoxia aguda (Ortega-Sáenz *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2017): I) El CMIV de las células glómicas presenta unas peculiaridades moleculares que probablemente incrementen su sensibilidad a la disminución de O₂ (Gao *et al.*, 2017); II) Las células glómicas tienen altos niveles de la piruvato carboxilasa y de biotina, ambos necesarios para la producción de oxalacetato, que es

un sustrato importante para incrementar el número de moléculas en el ciclo de Krebs (anaplerosis) (Ortega-Sáenz *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2017); III) Las células quimiosensitivas del CC presenta una alta concentración de succinato (Fernández-Agüera *et al.*, 2015), indicando que la resistencia de las células glómicas a la disfunción del CMI se debe a que su metabolismo oxidativo depende fundamentalmente del CMII. Todas estas características metabólicas sugieren que las células glómicas pueden tener un metabolismo activo cuyo objetivo principal es mantener elevado el ratio de quinona reducida *versus* quinona oxidada (CoQH₂/CoQ) (Fernández-Agüera *et al.*, 2015; Ortega-Sáenz *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2017). Se ha descrito, además, que en la mitocondrial el alto nivel de succinato y de CoQH₂ combinados inducen el transporte inverso de electrones en el CMI, lo que lleva a un incremento de ROS y NADH en el sitio FMN (Krishnamoorthy y Hinkle, 1988; Pryde y Hirst, 2011; Chouchani *et al.*, 2014; para una revisión detallada ver Murphy, (2009)); y que este fenómeno es bloqueado por rotenona (Lambert y Brand, 2004; Ortega-Sáenz *et al.*, 2013). Estos datos sugieren que durante la hipoxia el valor de CoQH₂ se ve incrementado rápidamente por un enlentecimiento de la CTE debido a la falta del aceptor final de electrones. La acumulación del CoQH₂ en hipoxia promueve la producción de ROS y NADH en el CMI (Figura 67 C y Figura 68), el incremento de ambas moléculas podrían actuar señalizando a los canales de la membrana plasmática para la activación de las células glómicas durante hipoxia. La importancia del ratio CoQH₂/CoQ para la capacidad de las células glómicas de responder a hipoxia ha sido demostrada modulando la actividad del CMII con DMSuc, un sustrato del CMII que potencia la respuesta a hipoxia; y con dimetil malonato (DMM), un inhibidor competitivo del CMII, que inhibe la activación de las células glómicas en hipoxia. Curiosamente, se ha demostrado que altos niveles de succinato y la reversión del CMI participan en varios procesos fisiopatológicos relevantes como el daño post-isquémico al corazón (Chouchani *et al.*, 2014) o el cambio al fenotipo pro-inflamatorio en macrófagos (Tannahill *et al.*, 2013; Mills *et al.*, 2016). Además, el nivel de quinona reducida actúa como sensor para ajustar la estabilidad de formación de supercomplejos mitocondriales (Guaras *et al.*, 2016).

En este contexto, la detección de hipoxia aguda por las células quimiosensitivas del CC debe verse como el resultado de una adaptación metabólica característica y específica de dichas células. Éstas presentan un CMIV diferente molecularmente que podría ser más sensible a O₂, un alto nivel de succinato y un metabolismo oxidativo que favorecen el elevado ratio CoQH₂/CoQ. Todo ello facilita que en hipoxia se produzca un enlentecimiento de la CTE, lo que conlleva a una acumulación de CoQH₂, al enlentecimiento o reversión del

CMI y al incremento de los niveles de NADH y ROS. Estas dos moléculas actuarían como señalizadoras inhibiendo los canales de K^+ de la membrana plasmática y produciendo la despolarización, entrada de calcio extracelular y liberación de neurotransmisores (Figura 68).

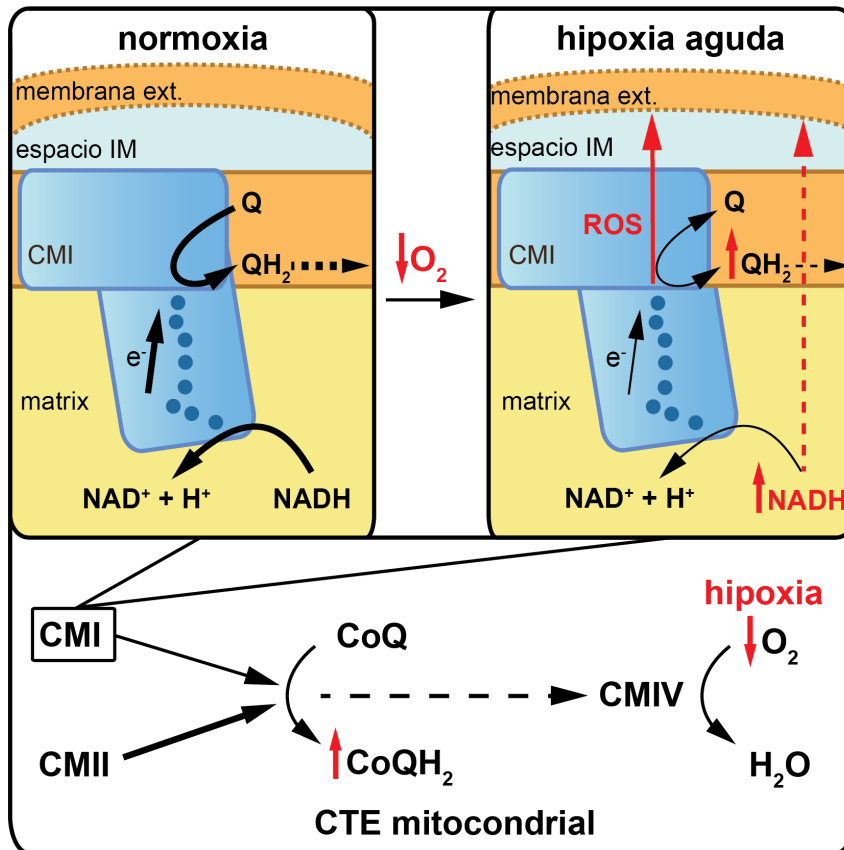


Figura 68. Modelo del CMI como señalizador de la respuesta a hipoxia en el cuerpo carotídeo. CoQ: quinona oxidada; CoQH₂: quinona reducida.

2. Papel del receptor Olfr78 en la respuesta aguda a la hipoxia

En paralelo con la publicación del modelo de Fernández-Agüera *et al.*, (2015), discutido en el apartado anterior, Chang *et al.*, (2015) han sugerido un modelo alternativo basado en que el receptor olfatorio Olfr78, que se expresa atípicamente en el CC y en otros tejidos, es esencial para detectar la hipoxia aguda en las células glómicas del CC. Estos autores han propuesto que el receptor se activa por lactato, un metabolito cuya concentración en sangre está regulada por la disponibilidad de oxígeno a nivel sistémico. Durante la hipoxia el incremento de lactato que se une al receptor Olfr78 activa al CC dando lugar a la RVH sistémica (Chang *et al.*, 2015).

Es importante señalar que el receptor atípico Olfr78 se expresa en tejidos que no son sensibles a hipoxia como el bulbo raquídeo (Conzelmann *et al.*, 2000) varios ganglios simpáticos y parasimpáticos (Weber *et al.*, 2002), riñón (Pluznick *et al.*, 2013) y colon

(Fleischer *et al.*, 2015), por lo que su función no tiene por qué estar vinculada con la detección de la disminución de PO₂.

Nuestros experimentos no han podido reproducir las observaciones de Chang *et al.*, (2015) ya que los ratones *knockout* para *Olfir78* estudiados (dos cepas con diferente origen) hiperventilan en respuesta a hipoxia aguda, siendo la cinética de activación de la respuesta respiratoria similar a la de los ratones controles. Los estudios a nivel celular, registrando secreción dopaminérgica en rodajas del CC o monitorizando el calcio intracelular en células glómicas dispersas, mostraron que las células glómicas procedente de ratones *knockout* para el gen *Olfir78* se activan en respuesta a hipoxia igual que las células controles. Es importante destacar, que estas preparaciones de cultivos primarios de CC son más específicas para estudiar la respuesta a hipoxia en CC que la técnica de registro de frecuencia de disparo en el nervio del seno de CC utilizada por Chang *et al.*, (2015). Además, los experimentos se realizaron con solución extracelular de registro sin lactato, y en el caso de las células glómicas dispersas no pudo haber una activación mediada por lactato de forma autocrina o paracrina ya que las células se encuentran aisladas y el flujo de la solución de registro es demasiado alto como para permitir la acumulación de lactato suficiente para activar a la célula glómica.

En paralelo a los experimentos discutidos en el párrafo anterior, hemos demostrado que efectivamente el CC es capaz de activarse en respuesta a un incremento de lactato extracelular. Sin embargo, la activación del CC por lactato no requiere del receptor *Olfir78*, ya que las células glómicas de animales deficientes en *Olfir78* respondieron a lactato igual que las células procedentes de animales control. Estos resultados se ven apoyados por dos publicaciones recientes que muestran que el lactato es un ligando de baja afinidad para *Olfir78* (Aisenberg *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2016). La activación del CC por lactato se discute en el siguiente apartado.

Los resultados mostrados en esta Tesis Doctoral descartan la hipótesis propuesta por Chang *et al.*, (2015), quienes atribuyen al receptor *Olfir78* un papel esencial para la detección de hipoxia aguda mediada por el CC, ya que demostramos que los ratones KO para *Olfir78* son capaces de responder a hipoxia aguda a nivel sistémico y celular. Tampoco podemos confirmar que el lactato sea un ligando para el receptor *Olfir78*, ya que las células glómicas de los ratones KO para *Olfir78* se activan igual que las controles por el incremento de lactato extracelular.

3. Metabolismo sistémico del lactato; importancia biológica y detección por el cuerpo carotídeo

De ser considerado una sustancia tóxica o un producto de deshecho el lactato ha pasado a ser reconocido actualmente como un metabolito importante a nivel fisiológico actuando como nutriente generador de ATP, como precursor gluconeogénico y como molécula señalizadora (Brooks, 2018). En esta Tesis Doctoral hemos estudiamos la contribución del lactato a la activación de las células glómicas bajo condiciones controladas de pH y PO₂, con el objetivo de esclarecer su papel en la modulación de los parámetros respiratorios.

El ejercicio moderado a nivel del mar produce un incremento de lactato y una acumulación de protones (disminución de pH) en sangre arterial (Sahlin *et al.*, 1976; Bangsbo *et al.*, 1993), aunque la PaO₂ no varía o lo hace de forma poco significativa (Bendahan *et al.*, 2017). No obstante, es bien conocido que el ejercicio físico produce una potente respuesta hiperventilatoria. Aunque se ha discutido en la literatura, la contribución del lactato al incremento de la frecuencia ventilatoria durante el ejercicio no está establecida (Lee *et al.*, 1996; Fregosi, 1998; Hardarson *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 2015; San-Millan y Brooks, 2018). La mayor dificultad para esclarecer el papel del lactato en la respuesta respiratoria durante el ejercicio radica en la separación del efecto del lactato del de la acidez láctica. Se conoce que el ácido láctico produce un incremento de la frecuencia ventilatoria en ratas (Lee *et al.*, 1996), lo que posiblemente se debe a que la disminución del pH plasmático activa los CC (Eyzaguirre y Koyano, 1965) y los quimiorreceptores centrales que promueven la respuesta respiratoria. No obstante, existen estudios donde se muestra que el lactato *per se*, en circunstancias controladas de pH, PaCO₂, PaO₂, produce un aumento de la frecuencia ventilatoria (Fregosi, 1998; Hardarson *et al.*, 1998), aunque no se describe el mecanismo de esta hiperventilación presumiblemente inducida por lactato. En este trabajo hemos estudiado la activación del CC por lactato en condiciones de normoxia y con control del pH extracelular para determinar si el metabolito efectivamente activa el CC y esclarecer su contribución a la respuesta ventilatoria sistémica.

Se ha descrito que 30 mM lactato activa el nervio del seno carotídeo (Chang *et al.*, 2015) sin embargo, fisiológicamente no es común encontrar esos valores a nivel arterial. Nuestros experimentos muestran por primera vez que concentraciones fisiológicas de lactato pueden activar el CC de manera dosis-dependiente, que la ruta de activación en respuesta a lactato concluye con una entrada de calcio extracelular y la liberación de dopamina y que además, esta activación no es debida a un cambio de pH extracelular ni a modificaciones

medibles de pH intracelular. Estos datos demuestran que el lactato *per se* y no una disminución del pH es el responsable de activar el CC durante un incremento de lactato extracelular.

La amplitud de la respuesta a 10 mM lactato es similar a la registrada durante hipoxia tanto en rodajas de CC como en células glómicas dispersas. Sin embargo, a nivel de secreción, no todas las células son capaces de responder a ambos estímulos durante el mismo registro, de hecho, solo el 65% de las células que respondieron a hipoxia tenían la capacidad para secretar dopamina cuando aplicamos 10 mM lactato, indicando que el CC es más sensible a la disminución de la PaO₂ que a esa concentración de lactato. Por el contrario, el número de células glómicas activadas por lactato, midiendo el incremento de calcio intracelular, es similar al número de células que responden a hipoxia. Estas diferencias cuantitativas podrían deberse a que los registros de calcio se realizan en células glómicas aisladas donde el contacto del lactato extracelular con la célula es más directo que en las preparaciones de rodajas de CC usadas para medir la actividad secretora.

Como se ha descrito anteriormente, la activación de las células glómicas en hipoxia se asocia con un incremento de ROS y NAHD (Fernández-Agüera *et al.*, 2015). Resultados preliminares, no mostrados en este trabajo, indican que el lactato produce un incremento de ROS-EIM. Además, mostramos que, al igual que la hipoxia, la exposición a lactato induce en las células glómicas un incremento de NADH que es “dosis-dependiente”. La acumulación de NADH durante lactato se inhibe al aplicar piruvato. Este hecho sugiere que el lactato se transporta al interior celular a través de los MCTs y se convierte en piruvato por la acción de la LDH produciendo NADH (Gutmann y Wahlefeld, 1974). El piruvato inhibe esta respuesta ya que es un competidor para el transporte de lactato a través de MCTs (García *et al.*, 1994) y porque una vez en el interior de la célula desplaza la reacción catalizada por la LDH en dirección opuesta. Desde el punto de vista cinético, el incremento de NADH producido por lactato es más rápido que el que se registra en respuesta a hipoxia. Esta observación sugiere que la señal de NADH inducida por la lactato es casi inmediata (se produce tan pronto el lactato entra en el citosol) mientras que la acumulación de NADH durante la exposición a hipoxia es el resultado de un enlentecimiento de la CTE, donde participan numerosos complejos proteicos (Fernández-Agüera *et al.*, 2015) y su medida requiere que el NADH intramitocondrial se equilibre con el citosólico por la lanzadera malato/oxalacetato.

Tanto el lactato como la hipoxia producen una despolarización y una entrada de calcio extracelular, sin embargo, a nivel electrofisiológico distinguimos dos tipos de células según su respuesta a lactato: las células que activan sus corrientes macroscópicas de K⁺ y otras

donde se inhiben. Aquellas células donde se inhiben las corrientes de K^+ en respuesta a lactato, tienen una respuesta similar a la descrita en el modelo de quimiotransducción aceptado de hipoxia. Es posible que estos dos tipos de células glómicas en función de la respuesta electrofisiológica a lactato reflejen los dos tipos de células descritas en la literatura en función de su metabolismo de lactato, las células productoras y las células consumidoras de lactato (Brooks, 2018); (ver “Introducción”). Actualmente no podemos explicar el significado biológico de aquellas células donde se ve un incremento de la corriente voltaje dependiente de potasio.

Los resultados de esta Tesis Doctoral demuestran que el incremento de lactato extracelular en normoxia y con condiciones controladas de pH produce la activación dosis-dependiente del CC. Esta activación está mediada por un incremento de NADH, una entrada de calcio y liberación de neurotransmisores. La activación del CC por lactato podría contribuir a la respuesta hiperventilatoria con el objetivo de incrementar los valores de O_2 fisiológicos y favorecer la obtención de energía a través del metabolismo oxidativo. Además, la expulsión de CO_2 durante la hiperventilación podría contribuir a controlar la disminución de pH que suele acompañar al incremento de lactato.

Como ocurre con el ejercicio físico, se ha descrito que existe un incremento de lactato transitorio durante la exposición aguda a hipoxia (Reeves *et al.*, 1992), aunque se desconoce su papel funcional. Nuestros resultados demuestran el incremento de la concentración de lactato en sangre tras 5 minutos de exposición a hipoxia en ratones silvestres y que además este aumento de lactato ocurre de forma inversamente proporcional a la disminución de los niveles de oxígeno. Los experimentos realizados *in vitro*, tanto en rodajas de CC como en células glómicas dispersas, muestran que existe una potenciación de la respuesta a hipoxia en presencia de lactato, tanto a nivel de NADH como a nivel de secreción dopaminérgica (Figura 69). El incremento de lactato sanguíneo durante la exposición a hipoxia aguda podría contribuir facilitando y potenciando la respuesta adaptativa a hipoxia.

Se ha descrito que a nivel celular el lactato alimenta el ciclo de Krebs para incrementar el metabolismo oxidativo (Hui *et al.*, 2017), y a nivel sistémico mejora el flujo sanguíneo y el abastecimiento de oxígeno en tejidos de cicatrización (Ribas, 2010), por lo que podría ser que el lactato producido durante una situación de hipoxia a nivel celular promueva el metabolismo oxidativo y a nivel sistémico facilite la respuesta del CC. Finalmente, teniendo en cuenta que en animales sin CC no se incrementan los niveles de lactato en sangre tras el ejercicio (Macías *et al.*, 2018), podría ser interesante estudiar en el futuro si la activación del CC, y el incremento del tono simpático derivado de dicha activación,

contribuyen al incremento de lactato en el musculo durante hipoxia y el ejercicio.

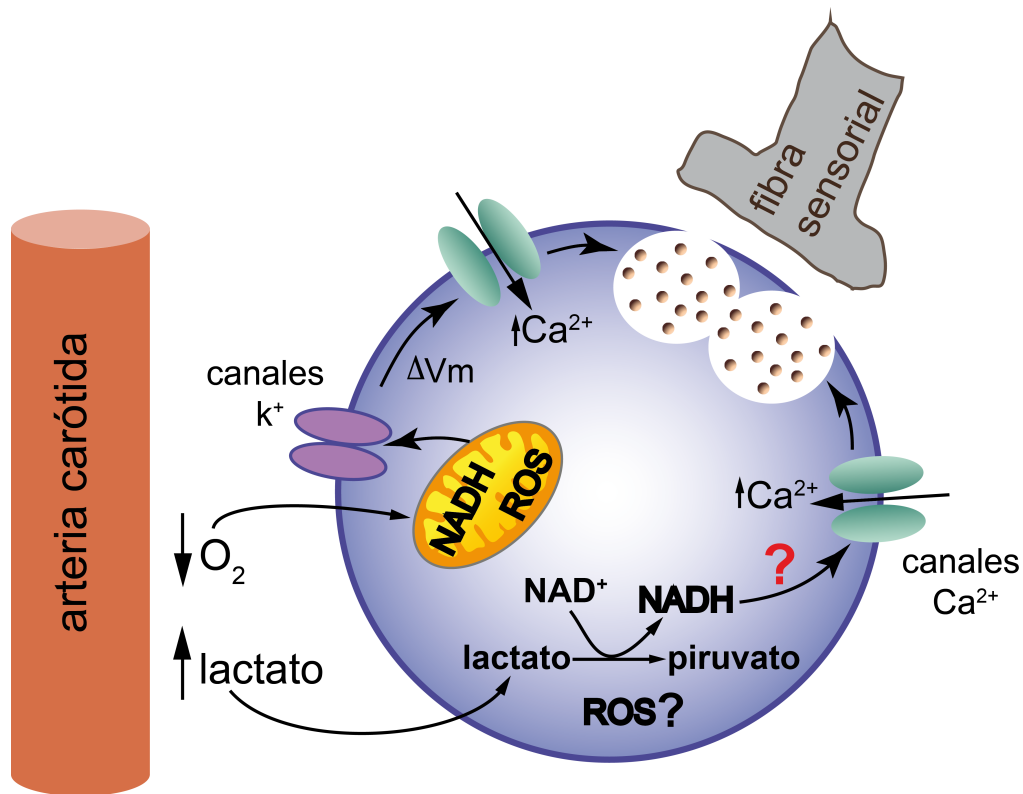


Figura 69. Efecto sumatorio de lactato e hipoxia en las células quimiosensitivas del cuerpo carotídeo. Ambos estímulos producen un incremento de NADH que contribuye a potenciar la respuesta secretora a hipoxia.

En resumen, nuestros resultados sugieren que el CC es un sensor metabólico, capaz de integrar múltiples estímulos como la hipoxia, la hipoglucemia, la hipercapnia, la disminución del pH y el incremento de lactato, para facilitar una respuesta compensatoria sistémica.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las células glómicas de ratón acumulan NADH y producen ROS a nivel del CMI en respuesta a hipoxia. El incremento de la señal de NADH en las células glómicas es “dosis-dependiente” (disminuye conforme aumentan los niveles de oxígeno).

2. El modelo de ratón condicional ESR-NDUFS2, que elimina la expresión del gen *Ndufs2* del complejo mitocondrial I (CMI) tras el tratamiento con tamoxifeno (TMX) en el adulto, pierde selectiva y gradualmente la respuesta a hipoxia sistémica y celular en paralelo con la disminución de la actividad NADH/ubiquinona oxidoreductasa.

3. Las células glómicas de ratones ESR-NDUFS2 presentan parámetros electrofisiológicos (potencial de membrana y resistencia de membrana) similares a los de las células de ratones controles. En las células glómicas del ratón ESR-NDUFS2 el nivel basal de oxidación es similar al de células controles. Aunque los niveles de NADH están incrementados, sus valores son muy inferiores a los de las células con déficit embrionario de *Ndufs2* (ratón TH-NDUFS2).

4. En células glómicas de ratones ESR-NDUFS2, que pierden la respuesta a hipoxia, los cambios en ROS y NADH inducidos por hipoxia están abolidos.

5. La capacidad de responder a hipoxia de las células glómicas controles no se afecta por la exposición aguda o crónica a piruvato o alfa-cetobutirato, agentes regeneradores de NAD^+ que bajan los niveles basales de NADH intracelular.

6. La disminución de NADH basal en células glómicas del ratón ESR-NDUFS2 utilizando agentes regeneradores de NAD^+ no se traduce en la recuperación de la respuesta a la hipoxia. La abolición de la respuesta a hipoxia en las células deficientes en *Ndufs2* se mantiene incluso en presencia de dimetil succinato, sustrato permeable del CMII que potencia la CTE vía CMII-CMIV.

7. La modulación del ratio CoQH_2/CoQ afecta a la capacidad para responder a hipoxia de las células glómicas en rodajas del CC. El incremento de CoQH_2 , utilizando dimetil

Conclusiones

succinato, potencia la respuesta a hipoxia. La inhibición del CMII, utilizando dimetil malonato, inhibe parcialmente la respuesta a hipoxia.

8. Los resultados derivados del estudio del modelo de ratones ESR-NDUFS2 sustentan de forma robusta el modelo de interacción mitocondria-membrana celular que explica la “sensibilidad” a hipoxia de las células quimiorreceptoras del CC. La detección de hipoxia aguda es el resultado de una adaptación metabólica característica y específica de dichas células. Estas peculiaridades metabólicas favorecen que en hipoxia se produzca un enlentecimiento de la CTE, lo que conlleva a una acumulación de CoQH_2 , al enlentecimiento o reversión del CMI y al incremento de los niveles de NADH y ROS. Estas dos moléculas actuarían como señalizadoras inhibiendo los canales de K^+ de la membrana plasmática y produciendo la despolarización, entrada de calcio extracelular y liberación de neurotransmisores.

9. El receptor olfatorio atípico Olfr78, que se expresa en el CC y en otras estructuras periféricas, no participa en la activación de las células glómicas por hipoxia ni por lactato. Por ello, en contra de lo publicado previamente, este receptor no es responsable de la regulación de la respiración por el oxígeno.

10. El incremento de lactato extracelular (L-lactato) activa las células glómicas del CC en condiciones de normoxia y sin producir alteraciones apreciables del pH intra o extracelular. La respuesta secretora inducida por lactato en las células glómicas es dependiente de la concentración. El lactato produce un incremento (dosis-dependiente) de NADH intracelular y una despolarización del potencial de membrana, lo que conlleva a la entrada de calcio extracelular y a la liberación de neurotransmisores.

11. La hipoxemia produce en ratones silvestres un incremento de lactato en sangre que es “dosis-dependiente” (aumenta conforme disminuyen los niveles de oxígeno). La lactatemia potencia la respuesta a hipoxia de las células glómicas.

12. Los resultados descritos en esta Tesis Doctoral indican que el CC no es solo un quimiorreceptor periférico, sino que actúa como un sensor del estado metabólico global del organismo, capaz de integrar múltiples estímulos como la hipoxemia, la hipoglucemia, la hipercapnia, la acidosis y la lactatemia. De este modo, el CC facilita la puesta en marcha de la

Conclusiones

respuesta compensatoria más adecuada ante situaciones fisiopatológicas extremas (aunque muy frecuentes) como el ejercicio físico, la limitación del intercambio gaseoso, o la estancia en grandes alturas, que cursan con modificaciones de uno o varios de estos parámetros y que pueden causar daño en tejidos especialmente sensibles como el cerebro o el corazón.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aisenberg WH, Huang J, Zhu W, Rajkumar P, Cruz R, Santhanam L, Natarajan N, Yong HM, De Santiago B, Oh JJ, Yoon AR, Panettieri RA, Homann O, Sullivan JK, Liggett SB, Pluznick JL & An SS. (2016). Defining an olfactory receptor function in airway smooth muscle cells. *Scientific reports* 6, 38231.

Archer SL, Huang J, Henry T, Peterson D & Weir EK. (1993). A redox-based O₂ sensor in rat pulmonary vasculature. *Circulation research* 73, 1100-1112.

Archer SL, Weir EK & Wilkins MR. (2010). Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: new concepts and experimental therapies. *Circulation* 121, 2045-2066.

Bangsbo J, Johansen L, Graham T & Saltin B. (1993). Lactate and effluxes from human skeletal muscles during intense, dynamic exercise. *The journal of physiology* 462, 115-133.

Baradaran R, Berrisford JM, Minhas GS & Sazanov LA. (2013). Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 494, 443-448.

Barros LF. (2013). Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends in neurosciences* 36, 396-404.

Bendahan D, Chatel B & Jue T. (2017). Comparative NMR and NIRS analysis of oxygen-dependent metabolism in exercising finger flexor muscles. *American journal of physiology regulatory, integrative and comparative physiology* 313, 740-753.

Bergersen LH. (2007). Is lactate food for neurons? Comparison of monocarboxylate transporter subtypes in brain and muscle. *Neuroscience* 145, 11-19.

Bergman BC, Horning MA, Casazza GA, Wolfel EE, Butterfield GE & Brooks GA. (2000). Endurance training increases gluconeogenesis during rest and exercise in men. *American journal of physiology endocrinology and metabolism* 278, 244-251.

Bergman BC, Wolfel EE, Butterfield GE, Lopaschuk GD, Casazza GA, Horning MA & Brooks GA. (1999). Active muscle and whole body lactate kinetics after endurance training in men. *Journal of applied physiology* 87, 1684-1696.

Birch-Machin MA & Turnbull DM. (2001). Assaying mitochondrial respiratory complex activity in mitochondria isolated from human cells and tissues. *Methods Cell Biology* 65, 97-117.

Birsoy K, Wang T, Chen WW, Freinkman E, Abu-Remaileh M & Sabatini DM. (2015). An essential role of the mitochondrial electron transport chain in cell proliferation is to enable aspartate synthesis. *Cell* 162, 540-551.

- Bozza T, Vassalli A, Fuss S, Zhang JJ, Weiland B, Pacifico R, Feinstein P & Mombaerts P. (2009). Mapping of class I and class II odorant receptors to glomerular domains by two distinct types of olfactory sensory neurons in the mouse. *Neuron* 61, 220-233.
- Broer S, Broer A, Schneider HP, Stegen C, Halestrap AP & Deitmer JW. (1999). Characterization of the high-affinity monocarboxylate transporter MCT2 in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochemical journal* 341, 529-535.
- Brooks GA. (2003). The metabolic systems: anaerobic metabolism (glycolytic and phosphagen). In *Exercise Physiology. People and Ideas*, ed. Tipton CM. New York: Oxford University Press, 322-60.
- Brooks GA, Donovan CM & White TP. (1984). Estimation of anaerobic energy production and efficiency in rats during exercise. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 56, 520-525.
- Brooks GA, Wolfel EE, Butterfield GE, Cymerman A, Roberts AC, Mazzeo RS & Reeves JT. (1998). Poor relationship between arterial [lactate] and leg net release during exercise at 4,300 m altitude. *The American journal of physiology* 275, 1192-1201.
- Brooks GA. (2002). Lactate shuttles in nature. *Biochemical Society transactions* 30, 258-264.
- Brooks GA. (2009). Cell-cell and intracellular lactate shuttles. *The journal of physiology* 587, 5591-5600.
- Brooks GA. (2018). The science and translation of lactate shuttle theory. *Cell Metabolism* 27, 757-785.
- Buckler KJ & Turner PJ. (2013). Oxygen sensitivity of mitochondrial function in rat arterial chemoreceptor cells. *The journal of physiology* 591, 3549-3563.
- Buckler KJ & Vaughan-Jones RD. (1994). Effects of hypoxia on membrane potential and intracellular calcium in rat neonatal carotid body type I cells. *The journal of physiology* 476, 423-428.
- Buckler KJ. (1997). A novel oxygen-sensitive potassium current in rat carotid body type I cells. *The journal of physiology* 498, 649-662.
- Chang AJ, Ortega FE, Riegler J, Madison DV & Krasnow MA. (2015). Oxygen regulation of breathing through an olfactory receptor activated by lactate. *Nature* 527, 240-244.
- Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijevic D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord ENJ, Smith AC, Eyassu F, Shirley R, Hu CH, Dare AJ, James AM, Rogatti S, Hartley RC, Eaton S, Costa ASH, Brookes PS, Davidson SM, Duchon MR, Saeb-Parsy K, Shattock MJ, Robinson AJ, Work LM, Frezza C, Krieg T & Murphy MP. (2014). Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 515, 431-435.

Bibliografía

Conzelmann S, Levai O, Bode B, Eisel U, Raming K, Breer H & Strotmann J. (2000). A novel brain receptor is expressed in a distinct population of olfactory sensory neurons. *The European journal of neuroscience* 12, 3926-3934.

Daly MdB, Lambertsen CJ & Schweitzer A. (1954). Observations on the volume of blood flow and oxygen utilization of the carotid body in the cat. *The journal of physiology* 125, 67-89.

de Castro F. (1926). Sur la structure et l'innervation de la glande intercarotidienne (glomus caroticum) de l'homme et des mammifères, et sur un nouveau système d'innervation autonome du nerf glossopharyngien. *Trab Lab Invest Biol Univ Madr* 24, 365-432.

de Castro F. (1928). Sur la structure et l'innervation du sinus carotidien de l'homme et des mammifères. Nouveaux faits sur l'innervation et la fonction du glomus caroticum. *Trav Lab Rech Biol* 25, 331-380.

Delpiano MA & Hescheler J. (1989). Evidence for a PO₂-sensitive K⁺ channel in the type-I cell of the rabbit carotid body. *FEBS letters* 249, 195-198.

Díaz-Castro B, Pintado CO, García-Flores P, López-Barneo J & Piruat JJ. (2012). Differential impairment of catecholaminergic cell maturation and survival by genetic mitochondrial complex II dysfunction. *Molecular and cellular biology* 32, 3347-3357.

Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson WC, Remington SJ & Tsien RY. (2004). Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *The journal of biological chemistry* 279, 22284-22293.

Dubouchaud H, Butterfield GE, Wolfel EE, Bergman BC & Brooks GA. (2000). Endurance training, expression, and physiology of LDH, MCT1, and MCT4 in human skeletal muscle. *American journal of physiology endocrinology and metabolism* 278, 571-579.

Duchen MR & Biscoe TJ. (1992a). Mitochondrial function in type I cells isolated from rabbit arterial chemoreceptors. *The journal of physiology* 450, 13-31.

Duchen MR & Biscoe TJ. (1992b). Relative mitochondrial membrane potential and [Ca²⁺]_i in type I cells isolated from the rabbit carotid body. *The journal of physiology* 450, 33-61.

Duchen MR, Caddy KW, Kirby GC, Patterson DL, Ponte J & Biscoe TJ. (1988). Biophysical studies of the cellular elements of the rabbit carotid body. *Neuroscience* 26, 291-311.

Emhoff CA, Messonnier LA, Horning MA, Fattor JA, Carlson TJ & Brooks GA. (2013). Gluconeogenesis and hepatic glycogenolysis during exercise at the lactate threshold. *Journal of applied physiology* 114, 297-306.

Eyzaguirre C, Koyano H & Taylor JR. (1965). Presence of acetylcholine and transmitter release from carotid body chemoreceptors. *The journal of physiology* 178, 463-476.

Eyzaguirre C & Uchizono K. (1961). Observation on the fibre content of nerves reaching the carotid body of the cat. *The journal of physiology* 159, 268-281.

Bibliografía

- Fernández-Agüera MC, Gao L, González-Rodríguez P, Pintado CO, Arias-Mayenco I, García-Flores P, García-Perganeda A, Pascual A, Ortega-Sáenz P & López-Barneo J. (2015). Oxygen sensing by arterial chemoreceptors depends on mitochondrial complex i signaling. *Cell metabolism* 22, 825-837.
- Fernández-Vizarra E, López-Perez MJ & Enriquez JA. (2002). Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells. *Methods* 26, 292-297.
- Fidone SJ & González C. (1986). Initiation and control of chemoreceptor activity in the carotid body. In *Handbook of Physiology*, ed. Fishman AP, Cherniak NS, Widdicombe JS & Geiger SR. American physiological society, Bethesda, USA.
- Fishman MC, Greene WL & Platika D. (1985). Oxygen chemoreception by carotid body cells in culture. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 82, 1448-1450.
- Fitzgerald RS, Shirahata M, Chang I & Kostuk E. (2009). The impact of hypoxia and low glucose on the release of acetylcholine and ATP from the incubated cat carotid body. *Brain research* 1270, 39-44.
- Fleischer J, Bumbalo R, Bautze V, Strotmann J & Breer H. (2015). Expression of odorant receptor Olf78 in enteroendocrine cells of the colon. *Cell and tissue research* 361, 697-710.
- Fletcher WM. (1907). Lactic acid in amphibian muscle. *The journal of physiology* 35, 247-309.
- Franco-Obregón A & López-Barneo J. (1996). Differential oxygen sensitivity of calcium channels in rabbit smooth muscle cells of conduit and resistance pulmonary arteries. *The journal of physiology* 491, 511-518.
- Fregosi RF. (1998). Invited Editorial on “Importance of the lactate anion”. *The american physiological society* 409-410
- Ganformina MD & López-Barneo J. (1991). Single K⁺ channels in membrane patches of arterial chemoreceptor cells are modulated by O₂ tension. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 88, 2927-2930.
- Gao L, Bonilla-Henao V, García-Flores P, Arias-Mayenco I, Ortega-Sáenz P & López-Barneo J. (2017). Gene expression analyses reveal metabolic specifications in acute O₂ -sensing chemoreceptor cells. *The journal of physiology* 595, 6091-6120.
- García CK, Goldstein JL, Pathak RK, Anderson RG & Brown MS. (1994). Molecular characterization of a membrane transporter for lactate, pyruvate, and other monocarboxylates: implications for the Cori cycle. *Cell* 76, 865-873.
- García-Fernández M, Ortega-Sáenz P, Castellano A & López-Barneo J. (2007). Mechanisms of low-glucose sensitivity in carotid body glomus cells. *Diabetes* 56, 2893-2900.
- Gladden LB. (2001). Lactic acid: New roles in a new millennium. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 98, 395-397.

- Guaras A, Perales-Clemente E, Calvo E, Acin-Perez R, Loureiro-López M, Pujol C, Martínez-Carrascoso I, Nunez E, García-Marques F, Rodríguez-Hernandez MA, Cortes A, Díaz F, Perez-Martos A, Moraes CT, Fernández-Silva P, Trifunovic A, Navas P, Vazquez J & Enriquez JA. (2016). The CoQH₂/CoQ ratio serves as a sensor of respiratory chain efficiency. *Cell reports* 15, 197-209.
- Gutmann I & Wahlefeld A. (1974). L-(+)-lactate determination with lactate dehydrogenase and NAD. In *methods of enzymatic analysis*, H. Bergmeyer, ed. (Academic Press), pp. 1464–1468.
- Guyenet PG. (2000). Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. *Respiration physiology* 121, 147-162.
- Halestrap AP & Meredith D. (2004). The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflügers Archiv: european journal of physiology* 447, 619-628.
- Halestrap AP & Price NT. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochemical journal* 343, 281-299.
- Halestrap AP, Wang X, Poole RC, Jackson VN & Price NT. (1997). Lactate transport in heart in relation to myocardial ischemia. *The american journal of cardiology* 80, 17A-25A.
- Hamill WT, Rest S & Nielson JA. (1981). Stress management in burn cases. *Topics in emergency medicine* 3, 93-96.
- Hardarson T, Skarphedinsson JO & Sveinsson T. (1998). Importance of the lactate anion in control of breathing. *Journal of applied physiology* 84, 411-416; discussion 409-410.
- Hashimoto T, Hussien R & Brooks GA. (2006). Colocalization of MCT1, CD147, and LDH in mitochondrial inner membrane of L6 muscle cells: evidence of a mitochondrial lactate oxidation complex. *American journal of physiology endocrinology and metabolism* 290, 1237-1244.
- Hashimoto T, Hussien R, Cho HS, Kaufer D & Brooks GA. (2008). Evidence for the mitochondrial lactate oxidation complex in rat neurons: demonstration of an essential component of brain lactate shuttles. *PloS one* 3, 2915.
- Hashimoto T, Hussien R, Oommen S, Gohil K & Brooks GA. (2007). Lactate sensitive transcription factor network in L6 cells: activation of MCT1 and mitochondrial biogenesis. *FASEB journal: official publication of the federation of american societies for experimental biology* 21, 2602-2612.
- Hayashi S & McMahon AP. (2002). Efficient recombination in diverse tissues by a tamoxifen-inducible form of Cre: a tool for temporally regulated gene activation/inactivation in the mouse. *Developmental biology* 244, 305-318.
- Heymans C, Bouckaert JJ & Dautrebande L. (1930). Sinus carotidien et réflexes respiratoires. II. Influences respiratoires réflexes de l'acidose de l'alcalose, de l'anhydride carbonique, de

Bibliografia

- l'ion hydrogène et de l'anoxémie: Sinus carotidiens et échanges respiratoires dans le poumons et au delà des poumons. *Arch Int Pharmacodyn* 39, 400-448.
- Hill AV, and Lupton, H. (1923). Muscular exercise, lactic acid, and the supply and utilization of oxygen. *QJM: An international journal of medicine* 16, 135-171.
- Hill AV. (1914). The oxidative removal of lactic acid. *The journal of physiology* 48, x-xi.
- Hirst J. (2013). Mitochondrial complex I. *Annual review of biochemistry* 82, 551-575.
- Hui S, Ghergurovich JM, Morscher RJ, Jang C, Teng X, Lu W, Esparza LA, Reya T, Le Z, Yanxiang Guo J, White E & Rabinowitz JD. (2017). Glucose feeds the TCA cycle via circulating lactate. *Nature* 551, 115-118.
- Jackson D. (1997). Lactate accumulation in the shell of the turtle *Chrysemys picta bellii* during anoxia at 3°C and 10°C. *The Journal of experimental biology* 200, 2295-2300.
- Jiang X, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP & Sucov HM. (2000). Fate of the mammalian cardiac neural crest. *Development* 127, 1607-1616.
- Jonz MG & Nurse CA. (2012). Peripheral chemoreceptors in air- versus water-breathers. *Advances in experimental medicine and biology* 758, 19-27.
- Kadenbach B & Huttemann M. (2015). The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion* 24, 64-76.
- Kashani-Poor N, Zwicker K, Kerscher S & Brandt U. (2001). A central functional role for the 49-kDa subunit within the catalytic core of mitochondrial complex I. *The journal of biological chemistry* 276, 24082-24087.
- Kim TY, Wang D, Kim AK, Lau E, Lin AJ, Liem DA, Zhang J, Zong NC, Lam MP & Ping P. (2012). Metabolic labeling reveals proteome dynamics of mouse mitochondria. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 11, 1586-1594.
- Kirsch JR & D'Alecy LG. (1983). Role of tissue lactate and substrate availability in 1,3-butanediol-enhanced hypoxic survival in the mouse. *Stroke* 14, 971-976.
- Krishnamoorthy G & Hinkle PC. (1988). Studies on the electron transfer pathway, topography of iron-sulfur centers, and site of coupling in NADH-Q oxidoreductase. *The journal of biological chemistry* 263, 17566-17575.
- Lambert AJ & Brand MD. (2004). Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *The journal of biological chemistry* 279, 39414-39420.
- Le Douarin NM. (1986). Cell line segregation during peripheral nervous system ontogeny. *Science* 231, 1515-1522.

- Lee PJ, Chatterton C & Leonard JV. (1996). Urinary lactate excretion in type 1 glycogenosis-a marker of metabolic control or renal tubular dysfunction?. *Journal of inherited metabolic disease* 19, 201-204.
- Lindeberg J, Usoskin D, Bengtsson H, Gustafsson A, Kylberg A, Soderstrom S & Ebendal T. (2004). Transgenic expression of Cre recombinase from the tyrosine hydroxylase locus. *Genesis* 40, 67-73.
- Linley JE. (2013). Perforated whole-cell patch-clamp recording. *Methods in molecular biology* 998, 149-157.
- Liu Y, Fiskum G & Schubert D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry* 80, 780-787.
- Livermore S, Piskuric NA, Buttigieg J, Zhang M & Nurse CA. (2011). Low glucose sensitivity and polymodal chemosensing in neonatal rat adrenomedullary chromaffin cells. *American journal of physiology-cell physiology* 301, 1104-1115.
- López-Barneo J, Benot, A and Ureña, J. (1993). Oxygen sensing and the electrophysiology of arterial chemoreceptor cells. *NIPS* 8, 191-195.
- López-Barneo J, González-Rodríguez P, Gao L, Fernández-Agüera MC, Pardal R & Ortega-Sáenz P. (2016). Oxygen sensing by the carotid body: mechanisms and role in adaptation to hypoxia. *American journal of physiology-cell physiology* 310, 629-642.
- López-Barneo J, López-López JR, Ureña J & González C. (1988). Chemotransduction in the carotid body: K⁺ current modulated by PO₂ in type I chemoreceptor cells. *Science* 241, 580-582.
- López-Barneo J, Ortega-Sáenz P, Pardal R, Pascual A, Piruat JI, Duran R & Gomez-Díaz R. (2009). Oxygen sensing in the carotid body. *Annals of the New York academy of sciences* 1177, 119-131.
- López-Barneo J, Pardal R & Ortega-Sáenz P. (2001). Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annual review of physiology* 63, 259-287.
- Macías D, Cowburn AS, Torres-Torrelo H, Ortega-Sáenz P, López-Barneo J & Johnson R. (2018). Correction: HIF-2alpha is essential for carotid body development and function. *eLife* 7.
- Martínez-Reyes I & Chandel NS. (2017). Waste not, want not: lactate oxidation fuels the TCA cycle. *Cell metabolism* 26, 803-804.
- Mazzeo RS, Brooks GA, Schoeller DA & Budinger TF. (1986). Disposal of blood [1-13C]lactate in humans during rest and exercise. *Journal of applied physiology* 60, 232-241.
- McClelland GB, Khanna S, González GF, Butz CE & Brooks GA. (2003). Peroxisomal membrane monocarboxylate transporters: evidence for a redox shuttle system? *Biochemical and biophysical research communications* 304, 130-135.

- McCullagh KJ, Juel C, O'Brien M & Bonen A. (1996). Chronic muscle stimulation increases lactate transport in rat skeletal muscle. *Molecular and cellular biochemistry* 156, 51-57.
- Meyerhof O. (1920). Die Energieumwandlungen im Muskel II. Das Schicksal der Milchsäure in der Erholungsperiode des Muskels. *Pflügers Archiv ges Physiol Mensch Tiere* 182, 284-317.
- Michelakis ED, Thebaud B, Weir EK & Archer SL. (2004). Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox regulation of O₂-sensitive K⁺ channels by a mitochondrial O₂-sensor in resistance artery smooth muscle cells. *Journal of molecular and cellular cardiology* 37, 1119-1136.
- Mills E & Jobsis FF. (1972). Mitochondrial respiratory chain of carotid body and chemoreceptor response to changes in oxygen tension. *Journal of neurophysiology* 35, 405-428.
- Mills EL, Kelly B, Logan A, Costa ASH, Varma M, Bryant CE, Turlomousis P, Dabritz JHM, Gottlieb E, Latorre I, Corr SC, McManus G, Ryan D, Jacobs HT, Szibor M, Xavier RJ, Braun T, Frezza C, Murphy MP & O'Neill LA. (2016). Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. *Cell* 167, 457-470.
- Montoro RJ, Ureña J, Fernández-Chacón R, Álvarez de Toledo G & Lopez-Barneo J. (1996). Oxygen sensing by ion channels and chemotransduction in single glomus cells. *The journal of general physiology* 107, 133-143.
- Mori K, Nakaya Y, Sakamoto S, Hayabuchi Y, Matsuoka S & Kuroda Y. (1998). Lactate-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Journal of molecular and cellular cardiology* 30, 349-356.
- Mulligan E & Lahiri S. (1982). Separation of carotid body chemoreceptor responses to O₂ and CO₂ by oligomycin and by antimycin A. *The American journal of physiology* 242, 200-206.
- Muñoz-Cabello AM, Toledo-Aral JJ, López-Barneo J & Echevarria M. (2005). Rat adrenal chromaffin cells are neonatal CO₂ sensors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 6631-6640.
- Muñoz-Cabello AM, Torres-Torrel H, Arias-Mayenco I, Ortega-Sáenz P & López-Barneo J. (2018). Monitoring functional responses to hypoxia in single carotid body cells. *Methods in molecular biology* 1742, 125-137.
- Murphy MP. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical journal* 417, 1-13.
- Nalbandian M & Takeda M. (2016). Lactate as a signaling molecule that regulates exercise-induced adaptations. *Biology* 5.
- Nurse CA & Piskuric NA. (2013). Signal processing at mammalian carotid body chemoreceptors. *Seminars in cell & developmental biology* 24, 22-30.

- Ortega-Sáenz P, Caballero C, Gao L & López-Barneo J. (2018). Testing acute oxygen sensing in genetically modified mice: plethysmography and amperometry. *Methods in molecular biology* 1742, 139-153.
- Ortega-Sáenz P, García-Fernández M, Pardal R, Alvarez E & López-Barneo J. (2003a). Studies on glomus cell sensitivity to hypoxia in carotid body slices. *Advances in experimental medicine and biology* 536, 65-73.
- Ortega-Sáenz P, Pardal R, García-Fernández M & López-Barneo J. (2003b). Rotenone selectively occludes sensitivity to hypoxia in rat carotid body glomus cells. *The journal of physiology* 548, 789-800.
- Ortega-Sáenz P, Levitsky KL, Marcos-Almaraz MT, Bonilla-Henao V, Pascual A & López-Barneo J. (2010). Carotid body chemosensory responses in mice deficient of TASK channels. *The journal of general physiology* 135, 379-392.
- Ortega-Sáenz P, Macías D, Levitsky KL, Rodríguez-Gomez JA, González-Rodríguez P, Bonilla-Henao V, Arias-Mayenco I & López-Barneo J. (2016). Selective accumulation of biotin in arterial chemoreceptors: requirement for carotid body exocytotic dopamine secretion. *The journal of physiology* 594, 7229-7248.
- Ortega-Sáenz P, Pardal R, Levitsky K, Villadiego J, Muñoz-Manchado AB, Duran R, Bonilla-Henao V, Arias-Mayenco I, Sobrino V, Ordonez A, Oliver M, Toledo-Aral JJ & López-Barneo J. (2013). Cellular properties and chemosensory responses of the human carotid body. *The journal of physiology* 591, 6157-6173.
- Ortega-Sáenz P, Pascual A, Gomez-Díaz R & López-Barneo J. (2006). Acute oxygen sensing in heme oxygenase-2 null mice. *The journal of general physiology* 128, 405-411.
- Pardal R & López-Barneo J. (2002). Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nature neuroscience* 5, 197-198.
- Pardal R, Ludewig U, García-Hirschfeld J & López-Barneo J. (2000). Secretory responses of intact glomus cells in thin slices of rat carotid body to hypoxia and tetraethylammonium. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 97, 2361-2366.
- Pardal R, Ortega-Sáenz P, Duran R & López-Barneo J. (2007). Glia-like stem cells sustain physiologic neurogenesis in the adult mammalian carotid body. *Cell* 131, 364-377.
- Pellerin L, Bergersen LH, Halestrap AP & Pierre K. (2005). Cellular and subcellular distribution of monocarboxylate transporters in cultured brain cells and in the adult brain. *Journal of neuroscience research* 79, 55-64.
- Philp NJ, Yoon H & Grollman EF. (1998). Monocarboxylate transporter MCT1 is located in the apical membrane and MCT3 in the basal membrane of rat RPE. *The american journal of physiology* 274, 1824-1828.

- Pierre K & Pellerin L. (2005). Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function. *Journal of neurochemistry* 94, 1-14.
- Piruat JI, Pintado CO, Ortega-Sáenz P, Roche M & López-Barneo J. (2004). The mitochondrial SDHD gene is required for early embryogenesis, and its partial deficiency results in persistent carotid body glomus cell activation with full responsiveness to hypoxia. *Molecular and cellular biology* 24, 10933-10940.
- Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, Brunet I, Wan LX, Rey F, Wang T, Firestein SJ, Yanagisawa M, Gordon JI, Eichmann A, Peti-Peterdi J & Caplan MJ. (2013). Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 4410-4415.
- Price NT, Jackson VN & Halestrap AP. (1998). Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochemical journal* 329, 321-328.
- Pryde KR & Hirst J. (2011). Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *The journal of biological chemistry* 286, 18056-18065.
- Ratcliffe PJ. (2013). Oxygen sensing and hypoxia signalling pathways in animals: the implications of physiology for cancer. *The journal of physiology* 591, 2027-2042.
- Reeves JT, Wolfel EE, Green HJ, Mazzeo RS, Young AJ, Sutton JR & Brooks GA. (1992). Oxygen transport during exercise at altitude and the lactate paradox: lessons from operation Everest II and Pikes Peak. *Exercise and sport sciences reviews* 20, 275-296.
- Ribas J. (2010). Lactate: from undesirable to valuable metabolite the role of lactate production in the regulation of the excitability during high power requirement in muscle fibres. *Archivos de medicina del deporte XXVII*, 137, 211-230.
- Richardson RS, Noyszewski EA, Leigh JS & Wagner PD. (1998). Lactate efflux from exercising human skeletal muscle: role of intracellular PO₂. *Journal of applied physiology* 85, 627-634.
- Rhoades RA & Bell DR. (2012). *Fisiología médica. principios de la medicina clínica*. 4^a ed. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, USA.
- Rogatzki MJ, Ferguson BS, Goodwin ML & Gladden LB. (2015). Lactate is always the end product of glycolysis. *Frontiers in neuroscience* 9, 22.
- Roth DA & Brooks GA. (1990). Lactate and pyruvate transport is dominated by a pH gradient-sensitive carrier in rat skeletal muscle sarcolemmal vesicles. *Archives of biochemistry and biophysics* 279, 386-394.

- Sahlin K, Harris RC, Nylin B & Hultman E. (1976). Lactate content and pH in muscle obtained after dynamic exercise. *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 367, 143-149.
- San-Millan I & Brooks GA. (2018). Assessment of metabolic flexibility by means of measuring blood lactate, fat, and carbohydrate oxidation responses to exercise in professional endurance athletes and less-fit individuals. *Sports medicine* 48, 467-479.
- Semenza GL. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148, 399-408.
- Stanley WC, Lee WR & Brooks GA. (1985). Ventilation studied with circulatory occlusion during two intensities of exercise. *European journal of applied physiology and occupational physiology* 54, 269-277.
- Starlinger H & Lubbers DW. (1976). Oxygen consumption of the isolated carotid body tissue (cat). *Pflügers Archiv: European journal of physiology* 366, 61-66.
- Sullivan LB, Gui DY, Hosios AM, Bush LN, Freinkman E & Vander Heiden MG. (2015). Supporting aspartate biosynthesis is an essential function of respiration in proliferating cells. *Cell* 162, 552-563.
- Tannahill GM, Curtis AM, Adamik J, Palsson-McDermott EM, McGettrick AF, Goel G, Frezza C, Bernard NJ, Kelly B, Foley NH, Zheng L, Gardet A, Tong Z, Jany SS, Corr SC, Haneklaus M, Caffrey BE, Pierce K, Walmsley S, Beasley FC, Cummins E, Nizet V, Whyte M, Taylor CT, Lin H, Masters SL, Gottlieb E, Kelly VP, Clish C, Auron PE, Xavier RJ & O'Neill LA. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1beta through HIF-1alpha. *Nature* 496, 238-242.
- Trabold O, Wagner S, Wicke C, Scheuenstuhl H, Hussain MZ, Rosen N, Seremetiev A, Becker HD & Hunt TK. (2003). Lactate and oxygen constitute a fundamental regulatory mechanism in wound healing. *Wound repair and regeneration: official publication of the wound healing society [and] the european tissue repair society* 11, 504-509.
- Ullah MS, Davies AJ & Halestrap AP. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *The journal of biological chemistry* 281, 9030-9037.
- Ureña J, Fernández-Chacón R, Benot AR, Alvarez de Toledo GA & López-Barneo J. (1994). Hypoxia induces voltage-dependent Ca^{2+} entry and quantal dopamine secretion in carotid body glomus cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10208-10211.
- Votyakova TV & Reynolds IJ. (2001). DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *Journal of neurochemistry* 79, 266-277.
- Waypa GB, Chandel NS & Schumacker PT. (2001). Model for hypoxic pulmonary vasoconstriction involving mitochondrial oxygen sensing. *Circulation research* 88, 1259-1266.

Bibliografia

Waypa GB, Marks JD, Guzy R, Mungai PT, Schriewer J, Dokic D & Schumacker PT. (2010). Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* 106, 526-535.

Waypa GB, Marks JD, Guzy RD, Mungai PT, Schriewer JM, Dokic D, Ball MK & Schumacker PT. (2013). Superoxide generated at mitochondrial complex III triggers acute responses to hypoxia in the pulmonary circulation. *Am J Respir Crit Care Med* 187, 424-432.

Weber M, Pehl U, Breer H & Strotmann J. (2002). Olfactory receptor expressed in ganglia of the autonomic nervous system. *Journal of neuroscience research* 68, 176-184.

Weir EK & Archer SL. (1995). The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9, 183-189.

Weir EK, López-Barneo J, Buckler KJ & Archer SL. (2005). Acute oxygen-sensing mechanisms. *The new england journal of medicine* 353, 2042-2055.

Wilson MC, Jackson VN, Heddle C, Price NT, Pilegaard H, Juel C, Bonen A, Montgomery I, Hutter OF & Halestrap AP. (1998). Lactic acid efflux from white skeletal muscle is catalyzed by the monocarboxylate transporter isoform MCT3. *The journal of biological chemistry* 273, 15920-15926.

Yoon H & Philp NJ. (1998). Genomic structure and developmental expression of the chicken monocarboxylate transporter MCT3 gene. *Experimental eye research* 67, 417-424.

Zhou T, Chien MS, Kaleem S & Matsunami H. (2016). Single cell transcriptome analysis of mouse carotid body glomus cells. *The journal of physiology* 594, 4225-4251.

Zilva JF. (1978). The origin of the acidosis in hyperlactataemia. *Annals of clinical biochemistry* 15, 40-43.

